Aus der Frauenklinik der Universität Tübingen
Geschäftsführender Direktor: Professor Dr. H. A. Hirsch

UNTERSUCHUNGEN ZUR OPTIMIERUNG DER RADIOIMMUNOASSAYS FÜR PROGESTERON UND ÖSTRADIOL (E_2) IM HINBLICK AUF DIE ANWENDUNG BEI DER OVULATIONSSTIMULATION MIT HMG UND HCG

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard - Karls - Universität
Tübingen

vorgelegt von

ROLF BREITENBÜCHER
aus Bietigheim-Bissingen

1982

Aus der Frauenklinik der Universität Tübingen
Geschäftsführender Direktor: Professor Dr. H. A. Hirsch

UNTERSUCHUNGEN ZUR OPTIMIERUNG DER RADIOIMMUNOASSAYS FÜR PROGESTERON UND ÖSTRADIOL (E_2) IM HINBLICK AUF DIE ANWENDUNG BEI DER OVULATIONSSTIMULATION MIT HMG UND HCG

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard - Karls - Universität
Tübingen

vorgelegt von

ROLF BREITENBÜCHER
aus Bietigheim-Bissingen

1982

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan:	Professor Dr. K. Voigt
1. Berichterstatter:	Professor Dr. A. E. Schindler
2. Berichterstatter:	Privatdozent Dr. E. Keller

---

gedruckt bei Hans- Joachim Köhler , Reprografischer Betrieb , Tübingen

Meinen Eltern

Vorwort

Ich möchte allen danken, ohne deren Hilfe diese Arbeit nicht hätte entstehen können.

Herrn Prof. Dr. med. A. Schindler, Frauenklinik der Universität Tübingen, für die Überlassung des Themas,

Herrn Dr. med. R. Göser, Frauenklinik der Universität Tübingen, für die Unterstützung bei der Bearbeitung des Themas.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536519_0038

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
	ABKÜRZUNGEN	
1.	EINLEITUNG	1
2.	FRAGESTELLUNG	3
3.	GERÄTE UND MATERIALIEN	4
3.1	Laborgeräte	4
3.2	Lösungen	5
3.3	Markierte Hormone	6
3.4	Stamm-Lösungen	7
3.5	Anti-Seren	7
3.6	Verwendete Plasmen	8
3.7	Kristalline Steroide (für Kreuzreaktion)	9
3.8	Geräte zur Zählung und Auswertung	10
3.9	Prog-Radioimmunoassay (RIA) - Prinzip der Methode	10
4.	EXPERIMENTELLER TEIL (VORVERSUCHE)	12
4.1	Bestimmung der Bindungskapazität	12
4.2	Untersuchungen zur Meßgenauigkeit der Radioaktivität bzw. statistische Unterschiede bei der Messung der Radioaktivität zu verschiedenen Wartezeiten (bis zur Messung) und bei verschiedenen Meßzeiten	14
4.3	Durchführung eines Prog-Radioimmunoassays	15
4.3.1	Erläuterung	15
4.3.2	Recovery	15
4.3.3	Extraktion	16
4.3.4	Aufstellung eines Prog-Standards	17
4.3.5	Arbeitsschritte	18
4.3.6	Trennung des freien vom gebundenen Hormon	19

4.3.7	Messung der Radioaktivität	19
4.3.8	Datenauswertung	20
4.3.8.1	Teile des Programms	20
4.4	Überprüfung auf Kreuzreaktion	21
5.	UNTERSUCHUNGEN ZUR ERSTELLUNG EINES DIREKTEN ASSAYS (HAUPTVERSUCHE)	24
5.1	Versuch zur Bestimmung der optimalen Plasmamenge	24
5.2	Untersuchung der Kinetik: Trennung der Hormone mit verschiedenen Kohle-Dextran-Suspensionen	25
5.3	Weitere Versuche zur Bestimmung der optimalen Plasmamenge	27
5.4	Untersuchungen zur Verkürzung der Inkubationszeit	29
5.5	Untersuchungen zur Verkürzung der Rüttelzeit auf dem Multivortex-Rüttler beim E_2-Radioimmunoassay	30
5.6	Untersuchungen zur Verkürzung der Inkubationszeit beim E_2-Radioimmunoassay	32
5.6.1	Recovery	32
5.6.2	Extraktion	33
5.6.3	Aufstellung eines E_2-Standards für die Standard(Eich)-Kurve	34
5.6.4	Arbeitsschritte	35
5.6.5	Trennung des freien vom gebundenen Hormon	36
5.6.6	Messung der Radioaktivität	36
5.6.7	Datenauswertung	36
5.6.7.1	Teile des Programms	36
6.	ERGEBNISSE	37
6.1	Bestimmung der Bindungskapazität	37
6.2	Untersuchungen zur Genauigkeit der Messung der Radioaktivität bzw. statistische Unterschiede bei der Messung der Radioaktivität bei verschiedenen Wartezeiten und verschiedenen Meßzeiten	37

6.3	Prog-Radioimmunoassay	38
6.3.1	Richtigkeit	38
6.3.2	Bindungskapazität	38
6.3.3	Unspezifische Bindung	39
6.3.4	Spezifität	39
6.4	Kreuzreaktionen	39
6.5	Untersuchung zur Bestimmung der optimalen Plasmamenge	39
6.6	Untersuchung zur Kinetik	40
6.7	Weitere Versuche zur Bestimmung der optimalen Plasmamenge	40
6.8	Untersuchung zur Verkürzung der Inkubationszeit	40
6.8.1	Richtigkeit der Methode	41
6.8.2	Bindungskapazität	41
6.8.3	Unspezifische Bindung	41
6.8.4	Spezifität	41
6.9	Untersuchung zur Verkürzung der Rüttelzeit beim Vortex-Rüttler	42
6.10	Untersuchung zur Verkürzung der Inkubationszeit beim E_2-Radioimmunoassay	42
7.	DISKUSSION	43
8.	ZUSAMMENFASSUNG	47
9.	METHODENVERGLEICH	48
	ANHANG (TABELLEN UND ABBILDUNGEN)	51
10.	LITERATURVERZEICHNIS	65
	LEBENSLAUF	

Abkürzungen

E_2	Östradiol
Prog	Progesteron
Tr	Verdünnung der markierten Hormone (Tracerverdünnung)
GP	Gelatine-Puffer 0,1 %
Upm	Umdrehungen pro Minute
Ria	Radioimmunoassay
Rec-Tr	Recovery-Tracer
cpm	counts per minute

1. EINLEITUNG

Zur Bestimmung der Hormone Progesteron und Östradiol (E_2) gibt es viele Methoden, z. B. v. ABRAHAM et al. (1971), FURUYAMA und NUGENT (1971), YOUSSEFNEJADIAN (1972), LINDNER et al. (1972), BODLEY et al. (1973), MIKHAIL et al. (1970), MISHELL et al. (1971), EMMENT et al. (1972), DOERR (1973), TULCHINSKY (1973) und FRIEDRICH et al. (1974); jedoch sind dies noch relativ langwierige und umständliche Verfahren. Dies gilt besonders dann, wenn man Tritium markierte Tracer anstelle von Jod markierten Tracern verwendet (Tritium markierte Tracer=β-Strahler, Jod markierte Tracer=γ-Strahler), weil bei Tritium markierten Tracern die Meßzeit wesentlich länger ist und weil man zum Messen Szintillationsflüssigkeit benötigt.
Auch müssen, bedingt durch die z. T. ungenügende Spezifität des Antiserums bzw. Antikörpers, noch Extraktionsschritte durchgeführt werden, denen sich dann Wiederfindungs- bzw. Recovery-Tests anschließen, die feststellen, wieviel man tatsächlich extrahiert hat.

Als weitere zeitraubende und aufwendige Faktoren erweisen sich auch die langen Inkubationszeiten (12 Std. und mehr), die Wartezeiten bis zum Messen der Proben (bis zu 2 Std.), die Trennung der freien von den gebundenen Hormonen durch Kohle-Dextran-Suspension und die Meßzeiten (2 min pro Probe bei Prog u. E_2, 10 min pro Probe bei Recovery).

Dies alles bedeutet aber, daß vom Zeitpunkt der Blutabnahme mindestens eineinhalb bis zwei Tage vergehen, ehe das Ergebnis feststeht. Solch ein Zustand ist verständlicherweise sehr unbefriedigend, wenn man bedenkt, daß es in der Praxis doch sehr viele Fälle gibt, bei denen man täglich die Hormonkonzentration von Prog und E_2 feststellen muß.
So z. B. bei der Ovulationsstimmulations-Therapie infertiler Frauen mit Dyneric-(Clomiphen) Gaben oder bei noch schwierigeren Fällen, durch die Substitutions-Therapie mit HMG-HCG.

Hier muß man täglich feststellen, wie die beiden Hormone auf diese Therapie reagiert haben - E_2 vor und Prog nach der Ovulation - um dann daraus zu bestimmen, ob eine Ovulation stattgefunden hat oder nicht; denn danach richtet sich dann das weitere Vorgehen in der Therapie.
Es ist deshalb eine Wunschvorstellung des Klinikers, morgens Blut abzunehmen und nachmittags (bzw. abends), vor Weiterführung der Therapie, im Besitz des Ergebnisses (sprich Hormonanstieg oder nicht) zu sein.
Zu diesem Zweck sind schon immer wieder verschiedene Ansätze gemacht worden, um die dafür notwendigen Assays zu vereinfachen; man bemühte sich, den E_2- sowie den Prog-Assay zu vereinfachen. Vorteilhaft bei der Vereinfachung des Prog-Assays ist dabei, daß die Prog-Werte, im Meßbereich wie er beim Assay gegeben ist, relativ hoch sind.
Das bedeutet, daß man da, wo ohnehin hohe Werte - 10 ng und mehr - gemessen werden, z. B. in der Corpus-luteum-Phase (Feststellung einer Insuffizienz) oder auch in der Frühschwangerschaft, versucht, diese Menge des Hormons im Plasma zu bestimmen.
Deshalb wird der Versuch gemacht, Plasmamengen direkt - evtl. ohne Extraktion - dem Assay einzugeben und damit die Hormonmenge direkt aus dem Plasma und was naheliegt, mit Zeitgewinn zu bestimmen.

Ein weiterer Gedanke kommt noch hinzu, nämlich: Kosteneinsparung, was ja ebenfalls kein unwesentlicher Faktor ist. Wenn z. B. im Falle eines Abortus imminens (drohender Abort) die Patientin in der Frühschwangerschaft - bei Corpus luteum Insuffizienz - blutet und in die Klinik kommt, dort ein bis zwei Wochen Bettruhe halten muß, bei einem Tageskostensatz von ca. 250 DM, und wenn sich dann hinterher herausstellt, daß ein Teil der Frucht schon abgestorben war, dann erscheint es wünschenswert, daß man den Prog-Gehalt im Plasma so schnell als möglich bestimmt, um einen weiteren Parameter zu gewinnen, mit der Absicht zu einer sicheren Prognose der Schwangerschaft zu gelangen.

2. FRAGESTELLUNG

Unter Berücksichtigung der oben aufgeführten Vorstellungen und Überlegungen, suchten wir also eine Assay-Methode, die in relativ kurzer Zeit eine sichere Aussage machen kann. Deshalb wird von uns der Versuch unternommen, die gegenwärtig in unserem Labor durchgeführte Methode abzukürzen und zu verbessern.
Es gibt zur Zeit von einigen Firmen Jod markierte Tracer für E_2, die jedoch sehr teuer sind; für Prog gibt es solche Tracer (mit zufriedenstellender Spezifität) derzeit nicht, so daß unsere Bemühungen vor allem dahingehen, die Assay-Methode für Prog zu untersuchen, besonders im Hinblick auf den Direkteinsatz von Plasma (also ohne Extraktion).
Dabei ergeben sich natürlich eine ganze Reihe von Problemen und Fragen.
Ein überaus wichtiges Problem ist das Verhalten der Proteine im Plasma vor allem hinsichtlich der Extraktion (beim Vorversuch), der Trennung der Hormone durch Kohle-Dextran-Suspension und hinsichtlich der unspezifischen Bindung des Tracers.
Deshalb soll untersucht werden, ob negative Einwirkungen der Proteine vorhanden sind. Wenn ja, soll dann versucht werden, diese zu verhindern, z. B. durch Änderung bzw. Ausgleich der Proteinkonzentration, indem man auch dem Standard Proteine (Plasma) zugibt oder durch Änderung der Kohle-Dextran-Suspension.
Außerdem soll versucht werden, mit möglichst wenig Materialien auszukommen, d. h., wenig Tracer, wenig Plasma und wenig Antiserum. Da sich aber das Antiserum beim Prog-Assay nicht sehr hoch verdünnen läßt, ist es ja natürlich, daß man zwangsweise viel Antiserum benötigt; deshalb also der Versuch - für einen grob klinischen Schnell-Assay - beim Tracer mit einer Countzahl von 5000 cpm anstatt mit 10 000 cpm auszukommen. Dies bedeutet, daß man mit einer geringeren Menge an Antigen-Antikörpergemisch auskommt, also auch mit weniger Antiserum.
Für eine streng wissenschaftliche Fragestellung dürfte dies vielleicht nicht ausreichend genau sein, doch sollte untersucht werden, ob dieses Verfahren für die Routine hinreichend genau ist.

3. GERÄTE UND MATERIALIEN

3.1 Laborgeräte

(1) Multi-Vortex-Shaker (No. 73-4326-12, Baird and Tatlock, Limited, Chadwell Heth, Essex, England)

(2) Zentrifuge (Cyrofuge 6-6, Typ 5912, Baujahr: 1973, Heraeus Christ GmbH, Osterode/Harz, Deutschland)

(3) Vakuumschrank (Typ VT 5042 EK, Heraeus Christ GmbH Osterode/Harz, Deutschland)

(4) GFL Rotor-Mixer (Type 3025, No. 10229774, Gesellschaft für Labortechnik mbH & Co., Hannover-Vinnhorst, Deutschland)

(5) Rotomix (Magnetic Stirrer No. 34524-200, Ceuco, Instrumente MIJ. N. V., Breda, Niederlande)

(6) Eppendorf-Pipetten (Eppendorf-Gerätebau Netheler + Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland)

(7) Zitopipetten (10:$^{1}/_{5}$, Bühler, Tübingen, Deutschland)

(8) Pipetten Tips (No. 72/9 blau, No. 52/9 gelb, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)

(9) Konstriktions-Pipetten (H. E. Pedersen, Dänemark)

(10) Polyäthylen-Zählfläschchen (714, Zinsser, Frankfurt/M., Deutschland)

(11) Verschlüsse zu Polyäthylen-Zählfläschchen (714 1 B, Zinsser, Frankfurt/M, Deutschland)

(12) Polypropylenreagensröhrchen (No. 105/16 SL, Art. Nr. 513, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)

(13) Eindrückstopfen (No. 146, Art. Nr. 116, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)

(14) Glasteströhrchen zu Zellwaschzentrifuge (75 12 mm, Wand 060, Merz & Dade GmbH, München, Deutschland)

(15) Reagenzgläser

(16) Laboratory Film (Parafilm "M", American Can Company, Dixie/Marathon,Greenwich, USA)

(17) Transport-Gitter

3.2 Lösungen

(18) Diäthyläther zur Analyse (Art. 921, Merck, Darmstadt, Deutschland)

(19) Petroleumäther zur Analyse (Mallinckrodt Inc., St. Louis, Missouri, USA)

(20) Szintillationsflüssigkeit (Unisolve 1, Koch-Light-Laboratories LTD, Colnbrook Bucks, England)

(21) Gelatinepuffer 0,1 %
Hergestellt aus destilliertem Wasser und Stammlösungen, die bei 4° C aufbewahrt wurden.
Stock A: 68,99 g NaH_2PO_4 H_2O zur Analyse (Art. 6346, Merck, Darmstadt) aufgefüllt auf 1 000 ml
Stock B: 17,8 g Na_2HPO_4 $2H_2O$ zur Analyse (Art. 6580, Merck, Darmstadt) aufgefüllt auf 1 000 ml
Stock C: 61,36 g NaCl krist. zur Analyse (Art. 6004, Merck, Darmstadt) aufgefüllt auf 1 000 ml
Jeder Stocklösung wurde, pro 1 000 ml, ein mg Thiomersal (Art. 11 375, Serva Feinbiochemica, Heidelberg, Deutschland) zugegeben.
In einen 1 000-ml-Meßkolben wurden folgende Reagenzien zugeführt:
Ein g Gelatine, reinst (Art. 22 151, Serva Feinbiochemica, Heidelberg, Deutschland)
1 mg Thiomersal (wie oben) sowie 6,6 ml Stock A, 66,7 ml Stock B, 113,3 ml Stock C.
Mit destilliertem Wasser wurde auf 1 000 ml aufgefüllt.
Um eine homogene Flüssigkeit zu erreichen, wurde der Meßkolben in ein Wasserbad (30° C) gestellt.
Nach dem Abkühlen wurde der Puffer bei 4° C aufbewahrt.

Aktivkohle-Dextran-Suspension

(22) Konzentration $\frac{5 \text{ mg Kohle}}{\text{ml}}$

In einem 500 ml Becherglas wurden 2,5 g Norit A (Art. 30 890, Serva Feinbiochemica, Heidelberg, Deutschland) und 0,25 g Dextran T 70 (Pharmacia fine chemicals, Upsala, Schweden) mit 0,1 %igem Gelatinepuffer (21) auf 500 ml aufgefüllt und 2 Std. mit dem Rotomix gerührt.
Die Suspension wurde bei 4^{o} C aufbewahrt und vor dem Gebrauch jeweils 15 min mit dem Rotomix gerührt.

(23) Konzentration $\frac{10 \text{ mg Kohle}}{\text{ml}}$

In einem 500 ml Becherglas wurden 5 g Norit A (s.o.) und 0,5 g Dextran T 70 (s.o.) mit 0,1 %igem Gelatinepuffer auf 500 ml aufgefüllt.
Aufbewahrung wie bei (22).

(24) Konzentration $\frac{20 \text{ mg Kohle}}{\text{ml}}$

In einem 500 ml Becherglas wurden 10 g Norit A (s.o.) und 1 g Dextran T 70 (s.o.) mit 0,1 %igem Gelatinepuffer auf 500 ml aufgefüllt und 2 Std. mit dem Rotomix gerührt.
Aufbewahrung wie bei (22) und (23).

3.3 Markierte Hormone

		Best.Nr.	Firma	Menge
(25)	Estradiol (E_2) 2,4,6,7-^{3}H(N)	NET 317	NEN	250 µCi
(26)	Progesterone 1,2-^{3}H(N)	NET 208	NEN	250 µCi

(27) Stamm-Tracer E_2: 250 µCi (25) wurden in 25 ml Benzol angeliefert, anschließend eingedampft und mit 25 ml Äthanol aufgenommen (2,4,6,7-^{3}H(N) 0,00059 mg)

(28) Stamm-Tracer Prog: 250 µCi (26) wurden in 25 ml Benzol angeliefert, anschließend eingedampft und mit 25 ml Äthanol aufgenommen (1,2-^{3}H(N) 0,0014 mg)

(29) Recovery-Tracer E_2: 180 µl Stamm-Tracer wurden in 5 ml GP gelöst

(30) Recovery-Tracer Prog: 180 µl Stamm-Tracer wurden in 5 ml GP gelöst

3.4 Stamm-Lösungen

(31) Stammlösung E_2: 100 mg E_2 pro 100 ml Äthanol

(32) Stammlösung Prog: 100 mg Prog pro 100 ml Äthanol

3.5 Anti-Seren

Eigene Antiseren-Herstellung in Anlehnung an die Methode von ABRAHAM (1973), modifiziert nach GÖSER (1978)

(33) Estradiol: Estradiol-6-carboxim: BSA als Antigen

(34) Progesteron: 4-Pregnen-11α-ol-3, 20-dione-hemisuccinat: BSA als Antigen

Immunisierungsvorgang

Ein mg Antigen und 27 µg BCG werden in 10 ml destilliertem Wasser gelöst. Zur Injektion wird 1 ml dieser Antigen-BCG-Solution mit 1 ml Complete Freunds Adjuvans in einer 2-ml-Spritze aufgezogen. Injiziert werden 10 - 12 Wochen alte männliche Kaninchen (jedes Kaninchen erhält 100 µg Antigen und 2,7 µg BCG) intracutan an ca. 10 Stellen auf dem Rücken und auf jeder Seite des Oberschenkels.
Nach vier Wochen wird 0,1 ml Blut aus der Ohrvene entnommen und aus dem gewonnenen Plasma eine 1:1000 Verdünnung mit 0,1 % Gelatine-Puffer hergestellt und nach dem üblichen Assayver-

fahren wird die Bindungsfähigkeit der Seren getestet. Diejenigen Kaninchen mit dem besten Antikörpertiter werden zur Boosterung ausgewählt.

Boosterinjektion

0,5 mg Antigen wird in 10 ml destilliertes Wasser gegeben. Ein ml dieser Antigenlösung wird zusammen mit 1 ml Incomplete Freunds Adjuvans in eine 2-ml-Spritze aufgezogen und in der oben beschriebenen Weise injiziert.
Die Boosterinjektion erfolgt mehrmals im Abstand von drei bis vier Wochen bis der Titer ausreichend erscheint. Die Blutentnahme erfolgt dann durch Herzpunktion.
Die Antiseren werden z. T. in Portionen von 1 ml, bei minus 20° C, eingefroren; z. T. werden sie mit 0,1 % GP (21) verdünnt und ebenfalls bei minus 20° C aufbewahrt. In dieser Konzentration werden sie für die Assays weiterverwendet.

(35) E_2-Antiserum-Verdünnung 1 : 100, Nr. 192

(36) Prog-Antiserum-Verdünnung 1 : 100, Nr. 166

3.6 Verwendete Plasmen

Die Plasmen wurden in Portionen von 15-20 ml, in Polyäthylen-Zählfläschchen (10), bei minus 20° C, aufbewahrt.

(37) weibliches Plasma

(38) männliches Plasma

3.7 Kristalline Steroide (für Kreuzreaktion)

		Ref. No.
(39)	1,3,5(10)-estratrien-3-ol, 17-one (Estrone (E_1))	E 2300
	1,3,5(10)-estratrien-3, 17β-diol (Estradiol (E_2))	E 950
	1,3,5(10)-estratrien-3,16α,17β-triol (Estriol (E_3))	E 2600
	4-Androsten-17-β-ol,3-one (Testosterone)	XPA 6900
	5α-Androstan-3,17-dione (Androstandione)	XPA 1630
	5α-Androstan-3α,17β-diol (Dihydroandrosterone)	XPA 1170
	5-Pregnen-3β-ol,20-one (Pregnenolone)	XPQ 5500
	4-Pregnen-16α-ol-3,10-dione (16α-Hydroxyprogesterone)	Q 3330
	4-Pregnen-21-ol-3,20-dione (11-Desoxycorticosterone)	XPQ 3460
	4-Pregnen-17α,21-diol-3,20-dione (11-Desoxycortisol)	XPQ 1610
	4-Pregnen-11β,17α,21-triol-3,20-dione (Cortisol)	XPQ 3880
	4-Pregnen-11β-ol-3,20-dione (11β-Hydroxyprogesterone)	XPQ 3270
	4-Pregnen-11α-ol-3,20-dione (11α-Hydroxyprogesterone)	Q 3240
	4-Pregnen-20α-ol,3-one (20α-Hydroxyprogesterone)	Q 3600
	4-Pregnen-20β-ol,3-one	Q 3630
	4-Pregnen-3,20-dione (Progesterone)	Q 2600

3.8 Geräte zur Zählung und Auswertung

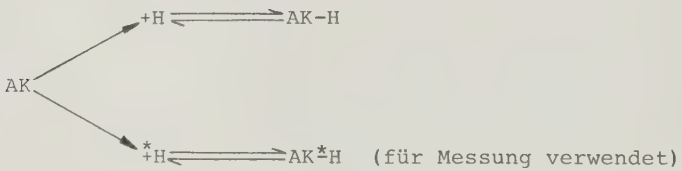
(40) Counter (Typ: BF 5000, F.Nr. 476 338, Labor Prof. Dr. Berthold, Wildbad, Deutschland)
Schreibmaschine zum Counter (Typ: Teletype Model 3320 3 WA, Labor Prof. Dr. Berthold, Wildbad, Deutschland)

(41) Tischcomputer (9810 A, Hewlett u. Packard, Böblingen, Deutschland)

(42) Calculator Plotter (9862 A, Hewlett u. Packard, Böblingen, Deutschland)

3.9 Prog-Radioimmunoassay (RIA) - Prinzip der Methode

Die radioimmunologische Methode zur quantitativen Bestimmung eines Hormons, wurde von BERSON and YALOW (1959) erstmals beschrieben. Die Methode beruht auf einer spezifischen Antigen-Antikörper-Reaktion, die durch Isotopenmarkierung empfindlich und quantitativ meßbar gemacht wird.
Das Prinzip kann folgendermaßen veranschaulicht werden:



H: das endogene Hormon (oder auch Standardmengen dieses Hormons) ist die Verbindung bzw. Menge, die bestimmt werden soll.

*H: stellt dieselbe Substanz (Hormon) dar, ist aber mit Tritium markiert und wird als Radioindikator hinzugefügt.

Das Antiserum enthält das spezifisch bindende Protein, den Antikörper (AK), der eine begrenzte Anzahl von Bindungsstellen für das Antigen (Hormon) bereithält.
Daraus resultiert nun eine kompetitive Hemmung der Bindung zwischen Antikörper (AK) und dem spezifisch radioaktiven Antigen (*H = radioaktiv markiertes Hormon).
Dies bedeutet, daß zunehmende Mengen des Hormons (H) zunehmende Mengen von gebundenem markiertem Hormon (AK-*H) verdrängen, also insgesamt weniger an AK-*H vorkommt.
So stellt also die Menge von AK-*H, in Relation zur initial dazugegebenen Menge von *H, ein exaktes Maß für die Menge an endogenem Hormon (H) in der Plasmaprobe dar.
Der Komplex AK-*H wird durch Zentrifugieren vom freien Teil *H, der zuvor durch Kohle-Dextran-Suspension absorbiert wurde, getrennt. Die Radioaktivität des gebundenen Teils (AK-*H), läßt sich dann im Counter messen.

4. EXPERIMENTELLER TEIL (VORVERSUCHE)

4.1 Bestimmung der Bindungskapazität

Bei der Bestimmung der Bindungskapazität soll erfaßt werden, inwieweit ein radioaktiv markiertes Hormon durch das Antiserum gebunden wird. Die Menge des eingesetzten Antiserums ist in diesem Test variabel, die Menge des radioaktiv markierten Hormons ist dagegen konstant.

Es wurde also untersucht, wie hoch sich die verschiedenen Antiseren verdünnen ließen und was für Bindungsverhältnisse sich daraus ergaben. Von diesen Gesichtspunkten ausgehend, wurde dann das Antiserum mit der geeignetsten Bindungskapazität für die weiteren Untersuchungen verwendet.

Durchführung

Die für diese Bestimmung verwendete Menge von 75 µl Prog-Stamm-Tracer (28), wurde in 10 ml GP (21) gelöst; diese Konzentration entsprach ca. 5 000 cpm.
Bei Estradiol sollte der verwendete Tracer 10 000 cpm besitzen und dazu wurden 180 µl des E_2-Stamm-Tracers (27) in 10 ml GP (21) gelöst.
Verwendet wurden Antiseren (34) und (33), die von verschiedenen Hasen - für Prog Hase Nr. 166, 167 und 168, für E_2 Hase Nr. 192 und 193 - gewonnen wurden.

Die angesetzten Antiserum-Verdünnungen lagen für Progesteron bei 1:1000, 1:1500 und 1:2500.
Für Estradiol lagen die Antiserum-Verdünnungen bei 1:5000 und 1:10000.

Die Antiserum-Verdünnung wurde in Reagenzgläsern (15) angesetzt; als Verdünnungsmedium diente GP (21).
In sechs Glasteströhrchen (14), die mit T (Totalaktivität) bezeichnet waren, wurden nun 100 µl Prog-Tracer-Verdünnung (5 000 cpm) und 200 µl GP (21) einpipettiert. Vier Glasteströhrchen (14), in dreifacher Ausführung, die mit As (Antiserum) bezeichnet waren, wurden mit 100 µl der entsprechenden Prog-Antiserum-Verdünnung, mit 100 µl Prog-Tr-Verdünnung (5 000 cpm) und mit 100 µl GP (21) beschickt.
Für Estradiol verlief die Prozedur in ähnlicher Weise, nur daß dabei E_2-Tracer-Verdünnung (10 000 cpm) und die entsprechende Antiserum-Verdünnungen (s.o.) verwendet wurden.
Die Glasteströhrchen (14) wurden kurz gemixt, auf ein Transport-Gitter (17) gestellt, mit Laboratory-Film (16) abgedeckt und 2 Std. bei 4° C inkubiert. Danach erfolgte die Trennung des freien vom gebundenen Hormon mittels 0,5 ml Kohle-Dextran-Suspension (22) und anschließender 20-minütiger Zentrifugation (2) bei 2700 Upm.
T-Gläser wurden nicht mit Kohle-Dextran-Suspension (22) behandelt, sondern ihnen wurde 500 µl GP (21) einpipettiert (6).
Alle Glasteströhrchen (14) wurden dann in Polyäthylen-Zählfläschchen (10), die mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit (20) gefüllt wurden, dekantiert.
Die Fläschchen wurden mit Deckeln (11) fest verschlossen, in den Counter (40) gestellt und nach 2 Std. gemessen und zwar bei Prog 2 min Zählzeit pro Fläschchen und bei Östradiol 10 min pro Fläschchen. Danach erfolgte die prozentuale Berechnung der Bindungskapazitäten.
(Durch den Zusatz von Kohle-Dextran-Suspension wurde das nichtgebundene Hormon entfernt. Der Quotient "Restaktivität zu eingegebener Aktivität" entspricht der Bindungskapazität.

Siehe Tabelle 1 und 2, S. 52

4.2 Untersuchung zur Meßgenauigkeit der Radioaktivität bzw. statistische Unterschiede bei der Messung der Radioaktivität zu verschiedenen Wartezeiten (bis zur Messung) und bei verschiedenen Meßzeiten

Hier soll statistisch untersucht werden, welche Wartezeiten bis zum Messen und welche Meßzeiten pro Probe sich für die weiteren Untersuchungen am günstigsten erweisen würden.

Durchführung

In sechsmal zehn Glasteströhrchen (14) wurden 100 µl Prog-Tr (5000 cpm) und 700 µl GP (21) pipettiert, kurz gemixt, auf ein Transport-Gitter (17) gestellt, mit Laboratory-Film (16) abgedeckt und anschließend 2 Std. bei 4° C inkubiert.
Die Trennung der freien von den gebundenen Hormonen erfolgte durch 0,5 ml Kohle-Dextran-Suspension (22) und 20-minütiger Zentrifugation (2) bei 2700 Upm.
Die Gläschen wurden dann in mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit (20) gefüllte Polyäthylen-Zählfläschchen (10) dekantiert. Danach erfolgte die Messung der Radioaktivität im Counter (40).

a) Meßzeit: 10 min pro Probe

1) 10 Proben nach einer Wartezeit von 30 min gemessen.
2) 10 Proben nach einer Wartezeit von 60 min gemessen.
3) 10 Proben nach einer Wartezeit von 120 min gemessen.

b) Meßzeit: 2 min pro Probe

1) - 3) wie bei a)

Die Auswertung der Daten erfolgte durch den Tischcomputer. Berechnet wurden Mittelwert, Standardabweichung und Standardfehler des Mittelwertes.

Siehe Tabelle 3, S. 53

4.3 Durchführung eines Prog-Radioimmunoassays

4.3.1 Erläuterung

Die bisher in unserem Labor durchgeführte Methode des Prog-Radioimmunoassays gliederte sich in zwei Schritte:

1) Isolierung der Steroide vom Plasma durch Extraktion.
2) Quantitative Bestimmung durch das radioimmunologische Verfahren.

In Anlehnung an diese Methode wurde mit dem Prog-Antiserum Nr. 166, der Antiserum-Konzentration 1:2000, dem Prog-Tracer mit der Countzahl 5000 cpm, der Wartezeit von 30 min und der Meßzeit von 2 min pro Probe ein Prog-Radioimmunoassay durchgeführt.
Der Radioimmunoassay wurde zweimal durchgeführt. Beim Assay Nr. 1 wurden der Wiederfindung Prog-Mengen von 20 pg, 50 pg, 100 pg, 500 pg und 1000 pg zugegeben; beim Assay Nr. 2 - wie beschrieben - waren die Prog-Mengen in der Wiederfindung wesentlich höher, nämlich 500 pg, 1000 pg, 2000 pg, 5000 pg und 10000 pg.
Dieser Assay sollte als Bezugssystem für die weiteren Untersuchungen und Verbesserungen dienen.

4.3.2 Recovery

In sechs mit 0,9 ml weiblichem Plasma (37) gefüllte Reagenzgläser (15) wurde, je Glas, 100 µl einer bestimmten Hormonlösung: 0 pg (=100 µl GP), 500 pg, 1000 pg, 2000 pg, 5000 pg, 10000 pg mit der Eppendorf-Pipette (6) einpipettiert und kurz gemixt.
Aus diesen Reagenzgläsern (15) wurden dann 300 µl mit der Eppendorf-Pipette (6) entnommen und in sechs Polypropylenreagenz-

röhrchen (12) einpipettiert; dazu wurden noch 10 µl Prog-Rec-Tracer (30) pipettiert und die Gläser mit Eindrückstopfen (13) verschlossen, dann auf ein Transport-Gitter (17) gestellt und 12 Std. bei 4° C inkubiert.
Vier Polyäthylen-Zählfläschchen (10), die mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit gefüllt waren, wurden 200 µl GP (21) und 10 µl Prog-Rec-Tr (30) zugesetzt und danach im Dunkeln 12 Std. bei 21° C (Zimmertemperatur) aufbewahrt. Sie dienten als 100%-Recovery-Wert.

4.3.3 Extraktion

Die Extraktion mit Petroleum-Äther führt zur Isolierung aller freien, nicht konjugierten Steroide im Plasma, wo sie auch von den spezifischen Plasmaproteinen abgetrennt werden. (ABRAHAM and ODELL 1970)

Nach der Inkubation wurden die sechs Polypropylenreagenzgläschen mit 5,5 ml Petroleum-Äther (19) aufgefüllt, wieder mit Eindrückstopfen (13) verschlossen und anschließend 1 Std. lang auf dem GFL-Rotor-Mixer (4) durchgemischt. Danach wurden sie, auf der mit 4° C vorgekühlten Zentrifuge (2), bei 3000 Upm, 20 min lang zentrifugiert.
Fünf ml des Überstandes wurden in Glasteströhrchen (14) abpipettiert und dann im Vakuumschrank(3) bei max. 40° C und 300 Torr eingedampft.
Anschließend wurde mit 500 µl Petroleum-Äther nachgespült, eingedampft, wieder mit 500 µl Petroleum-Äther nachgespült und nochmals eingedampft.
Danach wurde jedes Glasteströhrchen mit 500 µl GP (21) "aufgenommen" und anschließend 1 Std. lang auf dem Multivortex-Shaker (1) gerüttelt.
Nach dem Rütteln wurden 100 µl des Röhrcheninhaltes für die Wiederfindung verwendet und zusammen mit dem Ria-Standard pipettiert (s. dort).

Für Recovery wurden 200 µl verwendet. Deshalb wurde diese Menge in sechs - mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit (20) gefüllte - Polyäthylen-Zählfläschchen (10) einpipettiert und mit Verschlüssen (11) abgedichtet. Zusammen mit den vier 100%-Recovery-Proben wurden sie dann in den Counter (40) gestellt und nach 1 Std. Wartezeit, mit 10 min pro Probe, gemessen.
Nach dem Messen erfolgte die Berechnung der Mittelwerte für Recovery und 100%-Recovery. Daraus konnte der Recovery-Faktor ermittelt werden.
Dieser wurde bei der Datenauswertung im Klinikprogramm verwendet.

4.3.4 Aufstellung eines Prog-Standards

a) "B" = Background = Leerwert (dreifache Ausführung)
Als Leerwert mit dem Prog-Gehalt Null wurde nur GP verwendet.

b) "T" = Total = Gesamtaktivität (sechsfache Ausführung)
Für die Messung der Gesamtaktivität wurde GP und Prog-Tracer verwendet.

a) und b) wurden nach der Inkubation nicht mit Kohle-Dextran-Suspension behandelt.

c) "N" = Non specific = Unspezifische Bindung (dreifache Ausführung)
Um das Maß der unspezifischen Bindung erfassen zu können, wurde GP und Prog-Tracer verwendet.

d) O-Bindung = Bindungskapazität
Zur Bestimmung der Bindungskapazität wurde GP, Prog-Tracer und Prog-Antiserum-Verdünnung verwendet.

e) Standards
Die Progesteron-Stamm-Lösung wurde mit GP so verdünnt, daß in aufsteigender Reihe geeignete Konzentrationen erreicht wurden: 20 pg, 50 pg, 100 pg, 200 pg und 500 pg Prog pro 100 µl.

Die Glasteströhrchen enthielten also die entsprechende Prog-Konzentration, Prog-Tracer und Anti-Serum-Verdünnung (1:2000).

f) Proben (zweifache Ausführung)
Als Proben- bzw. Wiederfindungstestproben wurden sechs Glasteströhrchen mit weiblichem Plasma (37) bzw. bekannter Prog-Menge und weiblichem Plasma gefüllt.
(s. Extraktion)

4.3.5 Arbeitsschritte

a) Herstellung des Prog-Tracers (5000 cpm) aus dem Prog-Stamm-Tracer (28).

b) Herstellung der Prog-Antiserum-Verdünnung 1:2000 aus der eingefrorenen Prog-Antiserum-Verdünnung 1:100 (36).

c) Gelatine-Puffer (0,1%) bereitstellen.

d) In die "B-Gläser" = Leerwert wurden 300 µl GP (21) einpipettiert,

e) in die "T-Gläser" = Gesamtaktivität 200 µl GP (21) und 100 µl Prog-Tracer (5000 cpm) und

f) in die "N-Gläser" = Unspezifische Bindung wurden ebenfalls 200 µl GP (21) und 100 µl Prog-Tracer (5000 cpm) einpipettiert.

g) Die "O-Bindungs-Gläser" = Bindungskapazität erhielten 100 µl GP, 100 µl Prog-Tracer (5000 cpm) und 100 µl Prog-Antiserum-Verdünnung (1:2000).

h) In die Standards wurden 100 µl der entsprechenden Prog-Standard-Konzentration, 100 µl Prog-Tracer und 100 µl Prog-Antiserum-Verdünnung (1:2000) einpipettiert.

i) Den Proben- bzw. Wiederfindungstestgläsern wurden nach der Extraktion (s. dort) 100 µl, der durch 500 µl GP aufgenommenen Proben, einpipettiert; dazu kamen dann noch 100 µl Prog-Tracer (5000 cpm) und 100 µl Prog-Antiserum-Verdünnung (1:2000).

j) Alle Gläschen wurden kurz gemixt, auf ein Transportgitter (17) gestellt, mit Laboratory-Film (16) abgedeckt und dann 12 Std. bei 4° C inkubiert.

4.3.6 Trennung des freien vom gebundenen Hormon

Die Weiterbehandlung des Standards und der Proben nach der Inkubation, ist für Progesteron und Estradiol die gleiche. 0,5 ml Kohle-Dextran-Suspension (22), die zuvor durch 20 min langes Rühren mit dem Roto-Mix (5) in möglichst gleichmäßiger Suspension gehalten wurde, wurde mittels einer Pumpvorrichtung in jedes Glasteströhrchen (14) gegeben und gut vermischt. Die Glasteströhrchen, die nur GP bzw. GP und Prog-Tracer enthielten, also "B-Gläser" und "T-Gläser", wurden nicht mit Kohle-Dextran-Suspension versetzt, sondern ihnen wurde 500 µl GP (21) zugegeben.
Das Kohle-Dextran-Gemisch reagierte dann 15 min bei 4° C mit dem Inkubat und adsorbierte dabei das freie, radioaktiv markierte Hormon. Anschließend wurden die Glasteströhrchen auf der mit 4° C vorgekühlten Zentrifuge (2) 20 min lang bei 2000 Upm zentrifugiert. Der Überstand der Gläschen, der das gebundene radioaktiv markierte Hormon enthielt, wurde dann in Polyäthylen-Zählfläschchen (10), die mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit (20) gefüllt waren, dekantiert und in den Counter (38) gestellt. Dort blieben sie 30 min lang stehen, zur Sedimentation von Trübungen und zum Temperaturausgleich. Anschließend wurde die Radioaktivität gemessen.

4.3.7 Messung der Radioaktivität

Die Messung der Radioaktivität im Präzipitat geschah im automatischen Beta-Counter (40). Dieser Probenzähler bzw. Counter besitzt eine Kapazität von 200 Proben, sowie eine Temperaturstabilisierung der Meßkammer.

An den Counter ist eine Schreibmaschine angeschlossen, die die Probennummer , die Meßzeit (2 min pro Probe bei Prog; 10 min pro Probe bei Recovery und E_2) und die Countzahlen bzw. die gemessene Radioaktivität ausdruckte.

4.3.8 Datenauswertung

Die Hauptaufgabe bei der Auswertung eines Radioimmunoassays besteht darin, aus einer Anzahl von Standard (Eich)-Proben eine Standard-Kurve (logit-log-Transformation)zu berechnen und daraus die Hormonkonzentrationen von Patientenproben zu interpolieren.

Das Rechenprogramm ist auf Streifen gespeichert. Es wurde von Hand in den Tischcomputer (41) eingegeben.
Die Dateneingabe erfolgte in Verbindung mit den vom Counter ausgedruckten Meßwerten, die Datenausgabe in übersichtlicher Anordnung durch den Tischcomputer.
Die Standard(Eich)-Kurve kann durch den Plotter (42) gezeichnet werden.

4.3.8.1 Teile des Programms

a) Standard-Programm

Es setzt den Vorgang des Programmlesens in Gang.
Die vom Computer ausgedruckten Countzahlen des Standards wurden eingegeben.
Damit die Assay-Berechnung richtig ablief, mußten die Countzahlen der entsprechenden Polyäthylen-Zählfläschchen in einer bestimmten Reihenfolge eingegeben werden:

1) B = Background
2) T = Totalaktivität
3) N = Non-specific

4) O = Null-Bindung
5) Standards: 20 pg, 50 pg, 100 pg, 200 pg, 500 pg

b) Plotterprogramm

Dieses Programm zeichnete zunächst mit dem Plotter ein Achsenkreuz. Dann wurden die Standard-Werte (Mittelwert!) eingetragen und auf der X-Achse die obere und untere Meßbereichsgrenze, mittels Pfeilen, festgelegt.
Schließlich wurde die Standard-Kurve (in logit-log-Transformation) gezeichnet. Der Plotterausdruck ermöglichte also Kontrolle und Vergleich der Assays.

c) Klinikprogramm

Alle Proben mußten als Triplikate oder mindestens aber als Duplikate vorliegen.

Eingegeben wurde auch der Multiplikationsfaktor MF, der durch Extraktionsvolumen und Recovery gegeben war.

Im Klinikprogramm wurden ebenfalls Mittelwerte und Standardabweichungen berücksichtigt.

d) Lineare Regression

Sie wurde zur Überprüfung der Richtigkeit eingesetzt.
Dabei wurden die erwarteten und gefundenen Werte (Wiederfindung) zueinander in Beziehung gesetzt und statistisch durch die Berechnung der Regressionsgeraden erfaßt.
Der lineare Korrelationskoeffizient wurde ebenfalls ermittelt.

4.4 Überprüfung auf Kreuzreaktion

Durch die Überprüfung auf Kreuzreaktion soll die Spezifität des Antiserums bzw. Antikörpers überprüft werden, denn die Kreuzreaktionen eines Antikörpers beeinflussen die Spezifität

des Radioimmunoassays ganz entscheidend.
An ein klinisch brauchbares Antiserum wird die Anforderung gestellt, daß physiologisch vorkommende Steroide und ähnliche Substanzen im geforderten Meßbereich nicht mehr als 1-2% Kreuzreaktion mit dem Antiserum aufweisen.

Berechnet wird die Kreuzreaktion (in %) einer Substanz S mit einem Antikörper gegen Antigen A aus:

a) der Menge an unmarkiertem Antigen A, die 50% des radioaktiven Antigens aus der Bindung an den Antikörper verdrängen kann (A 50%);

b) der Menge an Substanz S, die ebenfalls 50% des radioaktiv markierten Antigens A aus der Antikörperbindung verdrängen kann (S 50%).

$$\text{Kreuzreaktionskoeffizient}_{50\%}: \frac{A_{50\,\%}}{S_{50\,\%}} \cdot 100$$

Durchführung

Für diese Untersuchung wurden die Antiseren Nr. 166 - für Prog - und Nr. 192 - für E_2 - und verschiedene Steroid-Hormone der C-18-, C-19- und C-21-Gruppe herangezogen und auf ihre Kreuzreaktivität untersucht.

Einem üblichen Prog-Standard bzw. E_2-Standard wurden verschiedene Hormonkonzentrationen der oben aufgeführten Steroid-Hormone (39) beigegeben. Die Behandlung des Standards bzw. der beigefügten Hormonkonzentrations-Proben (2fache Ausführung), erfolgte wie beim normalen Assay (ohne Extraktion) nämlich:

Nach dem Einpipettieren der Standardkonzentrationen, der Tracer-Menge, der Antiseren- und Hormonkonzentrationen in die Glasteströhrchen (14), erfolgte eine 12-stündige Inkubation bei 4° C, anschließend die Trennung der freien radioaktiven von den

gebundenen radioaktiven Hormonen durch Kohle-Dextran-Suspension (22) mit darauf folgender Zentrifugation (2), dann dekantieren, in den Counter (40) stellen, messen und anschließend die Datenauswertung mit dem Tischcomputer (39).

Siehe Tabelle 5 (Prog) und 6 (E_2), S. 54 und 55

5. UNTERSUCHUNGEN ZUR ERSTELLUNG EINES DIREKTEN ASSAYS (HAUPTVERSUCHE)

Bis jetzt wurden die Antiseren in bezug auf Konzentration, Bindungskapazität und Spezifität (Kreuzreaktion) getestet. Ferner wurden die günstigsten Warte- und Meßzeiten herausgefunden.

Unter diesen gegebenen Bedingungen wurde dann ein Prog-Ria mit Wiederfindung durchgeführt.
Dieser Ria wurde dann zur Ausgangsbasis für Vergleiche bei der Erprobung der Direkt-Ria-Verfahren.

Es wurde nun versucht, diesen Assay abzuwandeln.
Kontrolliert wurden die Versuche immer anhand der Wiederfindung und durch die, automatisch durch das Programm ausgewerteten, mathematischen Parameter.

5.1 Versuch zur Bestimmung der optimalen Plasmamenge

Es sollte herausgefunden werden, wie der Prog-Ria in bezug auf die Wiederfindung bekannter Prog-Mengen reagiert, wenn diese in verschiedenen Mengen Plasma gegeben werden, d. h. herausfinden, bei welcher Hormonkonzentration und bei welcher Plasma-Menge die prozentuale Wiederfindungsrate am genauesten ist.

Durchführung

Einem normalen Prog-Standard (wie oben beschrieben) wurden zwei Probenserien - bestehend aus je sechs Glasteströhrchen

(14) doppelte Ausführung - beigestellt.

In die erste Serie wurde mit der Eppendorf-Pipette (6) einpipettiert:

1) je Glasteströhrchen 100 µl "Prog-Standard-Verdünnung 100" = 100 pg Progesteron;
2) in aufsteigender Reihe pro Glasteströhrchen 0 µl, 5 µl, 10 µl, 20 µl, 30 µl, und 50 µl männliches Plasma;
3) je Glasteströhrchen 100 µl Prog-Antiserum-Tracer (5000 cpm)
4) je Glasteströhrchen 100 µl Prog-Antiserum-Verdünnung 1:2000.

In die zweite Serie wurde mit der Eppendorf-Pipette (6) einpipettiert:

1) je Glasteströhrchen 100 µl "Prog-Standard-Verdünnung 500" = 500 pg Progesteron;
2) - 4) wie bei der ersten Serie.

Die Weiterbehandlung - 12 Std. Inkubation bei 4^{o} C, Trennung der Hormone mit zentrifugieren, dekantieren, zählen im Counter, Daten auswerten - erfolgte wie bei dem oben aufgeführten Assay.

Siehe Tabelle 7 und Abbildung 1, S. 56 und 59

5.2 Untersuchung der Kinetik: Trennung der Hormone mit verschiedenen Kohle-Dextran-Suspensionen

Im vorangegangenen Versuch 5.1 hatte sich gezeigt, daß bei größeren Plasmamengen und vor allem bei höheren Prog-Konzentrationen die Wiederfindungsrate stark abfällt.
Diesen starken Abfall auszugleichen, war Gegenstand der weiteren Untersuchungen.

Dazu ergaben sich zwei Ansatzpunkte, nämlich:

a) daß man keine sehr hohen Prog-Konzentrationen mehr verwendete bzw. gemessen hat und

b) daß man die Kohle-Dextran-Konzentration, die dem Standard und den Proben zur Trennung des freien radioaktiven vom gebundenen radioaktiven Hormon zugesetzt wurde, erhöhte.

Gegenstand der folgenden Untersuchung war deshalb, die Trennung der Hormone mit Kohle-Dextran-Suspensionen unterschiedlicher Konzentration.

Durchführung

Aufgestellt wurden drei Prog-Standards, und jedem Standard wurden drei Probeserien - bestehend aus je vier Glasteströhrchen (14), in doppelter Ausführung, - zugegeben.

In die erste Serie wurde mit der Eppendorf-Pipette (6) einpipettiert:

1) je Glasteströhrchen 100 µl "Prog-Verdünnung 300" = 300 pg Progesteron;

2) in aufsteigender Reihe - pro Glasteströhrchen - 0 µl, 5 µl, 10 µl, 20 µl männliches Plasma (38);

3) je Glasteströhrchen 100 µl Prog-Tracer-Verdünnung (5000 cpm);

4) je Glasteströhrchen 100 µl Prog-Antiserum-Verdünnung (1:2000);

In die zweite Serie wurde mit der Eppendorf-Pipette einpipettiert:

1) je Glasteströhrchen 100 µl "Prog-Verdünnung 500" = 500 pg Progesteron;

2) - 4) wie bei der ersten Serie.

Und in die dritte Serie wurde mit der Eppendorf-Pipette (6) einpipettiert:

1) je Glasteströhrchen 100 µl "Prog-Verdünnung 700" = 700 pg Progesteron;

2) - 4) erfolgte wie bei der ersten und zweiten Serie.

Diese drei Standards mit ihren Probenserien (Wiederfindung) wurden 12 Std. bei 4^{o} C inkubiert.
Die anschließende Trennung des freien vom gebundenen Hormon erfolgte durch verschiedene Kohle-Dextran-Suspension-Konzentrationen.

Der erste Standard mit den Proben wurde mit einer Kohle-Dextran-Suspension von 5 mg Kohle pro ml (22) abgestoppt; der zweite mit 10 mg Kohle pro ml (23) und der dritte mit 20 mg Kohle pro ml (24).

Die weitere Behandlung der drei Standards mit Proben, 15 min bei 4^{o} C stehen lassen, zentrifugieren, dekantieren, zählen und Daten auswerten, entsprach den üblichen Assay-Ausführungen.

Siehe Tabelle 8 und Abbildung 2 a) b) c), S. 56, 60 und 61

5.3 Weitere Versuche zur Bestimmung der optimalen Plasmamenge

In dem vorausgegangenen Versuch 5.2 wurde erkennbar, daß bei Prog-Konzentrationen im Bereich von 300 - 500 pg, bei Plasmamengen bis zu 20 µl und bei Verwendung einer 4fachen Kohle-Dextran-Konzentration (20 mg Kohle pro ml) man gerade noch hinreichend verläßliche Ergebnisse erhielt, die für die Routine-Praxis noch anwendbar wären. Doch diese noch relativ unsichere Methode sollte noch verbessert werden, denn nicht zufriedenstel-

lend war vor allem der große Verlust an Hormonen bei hohen Hormonkonzentrationen im Plasma bei der Wiederfindung.

Diesen Hormonverlust führten wir vor allem auf zwei Ursachen zurück:

1) auf die spezifische Bindung, die ja mit 6 - 8 % relativ hoch war;
2) auf die relativ niedrige Countzahl von 5000 cpm.

Da wir aber die niedrigen Countzahlen beibehalten wollten, denn sie bedingen ja auch einen geringeren Verbrauch von Antiserum und Plasma - für unsere Methode ebenfalls von erheblicher Bedeutung - versuchten wir, den Einfluß der unspezifischen Bindung so gut wie möglich zu vermindern.
Wir machten deshalb den Versuch, auch dem Standard Plasma zuzusetzen, und dazu eignete sich das verwendete männliche Plasma (38) besonders gut, weil es praktisch kein Prog bzw. nur sehr geringe Mengen besitzt, also quasi dem Leerwert äquivalent ist; ebenso enthält es auch kaum Substanzen - abgesehen von Glucokorticoiden und geringfügigen Mengen von Androgenen - die Kreuzreaktionen verursachen.

Durchführung

Vier Prog-Standards wurden aufgestellt und jedem Standard wurden - als Wiederfindung - acht Glasteströhrchen (14), in doppelter Ausführung, beigegeben. In die Wiederfindungs-Röhrchen wurden mit der Eppendorf-Pipette (6) 100 µl verschiedener Prog-Konzentrationen in aufsteigender Reihe 20 (= 20 pg), 50 (= 50 pg), 100 (= 100 pg),200 (= 200 pg), 300 (= 300 pg), 350 (= 350 pg), 400 (= 400 pg) und 500 (= 500 pg) einpipettiert. Dazu kamen noch 100 µl Prog-Tracer-Verdünnung (5000 cpm) und 100 µl Prog-Antiserum-Verdünnung (1:2000).

In die Wiederfindungs-Proben des ersten Assays wurden anschließend mit der Eppendorf-Pipette (6) 10 µl männliches

Plasma (38) und in die Wiederfindungs-Probe des zweiten Assays 20 µl männliches Plasma einpipettiert.

In den dritten Assay wurden dann 20 µl männliches Plasma in die Wiederfindungs-Proben und in die Standards einpipettiert und beim vierten Assay wurden 10 µl männliches Plasma (38) in die Wiederfindungs-Proben und in die Standards einpipettiert.

Alle vier Assays wurden dann 12 Std. bei 4^{o} C inkubiert, mit Kohle-Dextran-Suspension (24) die Hormone getrennt, anschliessend zentrifugiert, dekantiert, gezählt und die Daten ausgewertet.

Siehe Tabelle 9 und Abbildung 3, S. 57 und 62

5.4 Untersuchungen zur Verkürzung der Inkubationszeit

Es hatte sich gezeigt, daß man eine bessere Wiederfindung erreicht, wenn man Plasmamengen von ca. 10 µl verwendet und diese dann auch dem Standard zusetzte.

Hiermit war nun eine Methode gefunden, Progesteron direkt aus dem Plasma - mit hinreichender Genauigkeit - zu bestimmen. Jedoch war die Durchführungsdauer dieser Methode, bedingt durch die lange Inkubationszeit, noch relativ lang. Deshalb wurde versucht, die Inkubationszeit zu reduzieren.

Durchführung

Es wurden wieder vier Standards aufgestellt und - als Wiederfindung - sechs Glasteströhrchen (14), in doppelter Ausführung, zugestellt.
In die Wiederfindungs-Röhrchen wurden mit der Eppendorf-Pipette (6) 100 µl verschiedener Prog-Konzentrationen in aufstei-

gender Reihe einpipettiert:
20 (= 20 pg), 50 (= 50 pg), 100 (= 100 pg), 200 (= 200 pg), 350 (= 350 pg) und 500 (= 500 pg).
Hinzu kamen noch 100 µl Prog-Tracer-Verdünnung (5000 cpm), und 100 µl Prog-Antiserum-Verdünnung (1:2000). In die Standards und in die Wiederfindungs-Proben wurden dann 10 µl männliches Plasma (38) pipettiert.
Der erste Assay (Standards und Wiederfindung) wurde dann 2 Std. bei 4° C inkubiert, der zweite Assay wurde 4 Std. bei 4° C inkubiert, der dritte Assay wurde 1 Std. bei 21° C (Zimmertemperatur) inkubiert und der vierte Assay wurde 1 Std. bei 37° C (Wasserbad) inkubiert.
Nach der Inkubation wurden alle vier Assays mit Kohle-Dextran-Suspension (24) abgestoppt, dann 15 min bei 4° C stehengelassen, anschließend zentrifugiert, dekantiert, gezählt und die Daten ermittelt.

Siehe Tabelle 10, S. 57 und Abbildungen 4 und 5, S. 63 und 64

5.5 Untersuchungen zur Verkürzung der Rüttelzeit auf dem Multi-Vortex-Rüttler beim E_2-Radioimmunoassay

Beim E_2-Ria ist bei der Extraktion der Arbeitsgang "Rütteln auf dem Multi-Vortex-Shaker"zur Durchmischung des Plasma-Äther-Gemisches notwendig.
Dieser Arbeitsvorgang dauerte bisher 1 Std.

Durch den folgenden Versuch sollte untersucht werden, ob auch "Rüttelzeiten" von kürzerer Dauer möglich wären.

Durchführung

In dreimal sieben Polypropylen-Reagenzröhrchen (12) wurden mit einer Eppendorf-Pipette (6) 500 µl weibliches Plasma (37) und 10 µl E_2-Recovery-Tracer (29) einpipettiert. Die Röhr-

chen wurden auf ein Transport-Gitter (17) gestellt, mit Eindrückstopfen (13) verschlossen und 12 Std. bei 4° C inkubiert.

In vier Polyäthylen-Zählfläschchen (10), die mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit (20) gefüllt waren, wurden 10 µl E_2-Recovery-Tracer (29) und 800 µl GP (21) einpipettiert.
Sie stellten den 100%-Wert dar. Die Polyäthylen-Zählfläschchen (10) wurden verschlossen und 12 Std. bei 21° C im Dunkeln aufbewahrt.

Nach der Inkubation wurden die einundzwanzig Polypropylen-Reagenzröhrchen (12) mit 3 ml Diäthyl-Äther (18) gefüllt und wieder mit Stopfen (13) verschlossen; anschließend wurden sie auf dem Multi-Vortex-Shaker(1) gerüttelt und zwar:

a) sieben Röhrchen 5 min lang,
b) sieben Röhrchen 15 min lang,
c) sieben Röhrchen 30 min lang.

Danach wurden sie auf ca. minus 10° C eingefroren.
Der dabei entstandene Überstand wurde in Glasteströhrchen (14) gekippt und im Vakuum-Schrank (3) bei max. 40° C und 300 Torr eingedampft, mit 500 µl Diäthyl-Äther (18) nachgespült und nochmals eingedampft.
Die Röhrchen (14) wurden dann mit 800 µl GP (21) "aufgenommen", kurz gemischt und dann in siebenmal drei, mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit (20) gefüllte, Polyäthylen-Zählfläschchen (10) dekantiert.
Diese wurden dann mit Deckeln (11) verschlossen und mit den 100%-Werten in den Counter (38) gestellt, nach 30 min Wartezeit mit einer Meßzeit von 10 min pro Zählfläschchen gemessen.
Anschließend wurde die prozentuale Abweichung der Countzahlen der Proben von den 100%-Werten ermittelt.

Siehe Tabelle 11, S. 58

5.6 Untersuchungen zur Verkürzung der Inkubationszeit beim E_2-Radioimmunoassay

Ebenso wie beim Prog-Ria waren in unserem Labor auch beim E_2-Ria die Inkubationszeiten relativ lang, bis zu 12 Std. und mehr. Dies beruhte vor allem auch darauf, daß aus arbeitstechnischen Gründen, die Standards mit den Proben, kurz vor Ende der täglichen Arbeitszeit (16^{OO}), zur Inkubation in den Kühlraum gestellt wurden und daß somit wenig Leerzeiten im Arbeitsablauf des Rias entstanden.

Mit den folgenden Untersuchungen sollte versucht werden, ähnlich wie beim Prog-Schnell-Ria, auch beim E_2-Ria mit einer kürzeren Inkubationszeit auszukommen.

5.6.1 Recovery

Vier Polypropylen-Reagenzgläschen (12) wurden mit 500 µl weiblichem Plasma (37) gefüllt, dazu wurden 10 µl E_2-Recovery-Tracer (29) pipettiert.
Die Röhrchen wurden mit Spezialstopfen (13) verschlossen und 12 Std. bei 4^{O} C inkubiert.
In vier - mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit (20) gefüllte - Polyäthylen-Zählfläschchen (10) wurden 800 µl GP (21) und 10 µl E_2-Recovery-Tracer (29) einpipettiert. Dann wurden sie (100%-Recovery) 12 Std. im Dunkeln bei 21^{O} C (Zimmertemperatur) aufbewahrt.

Nach der Inkubation wurden die Recovery-Proben mit den Standard-Proben (bzw. Wiederfindung) weiterbehandelt (siehe dort).

5.6.2 Extraktion

In fünf Polypropylen-Reagenzgläschen (12), in 8facher Ausführung, wurden aus einer E_2-Verdünnung (31) folgende Mengen einpipettiert (6):

In die zweite Probe 10 µl = 100 pg, in die dritte 30 µl = 300 pg, in die vierte 60 µl = 600 pg und in die fünfte 90 µl = 900 pg; mit GP (21) wurde auf 100 µl aufgefüllt. Dann wurde in die Proben zwei bis vier 400 µl und in die erste Probe 500 µl männliches Plasma pipettiert.
Die Proben wurden kurz von Hand gemixt, auf ein Transport-Gitter (17) gestellt und 12 Std. bei 4° C inkubiert.
Nach der Inkubation wurden Proben- und Recovery-Gläschen gemeinsam weiterbehandelt. Sie wurden mit 3 ml Diäthyl-Äther (18) gefüllt, mit Stopfen (13) verschlossen und anschließend 5 min lang auf dem Multi-Vortex-Shaker (1) gerüttelt; danach 20 min bei 4300 Upm zentrifugiert (2) und auf minus 10° C eingefroren.
Der Überstand wurde in Glastest-Röhrchen (14) gekippt, im Vakuum-Schrank (3) bei max. 40° C und 300 Torr eingedampft, mit 500 µl Diäthyl-Äther (18) nachgespült und nochmals eingedampft.
Die Proben-Gläschen wurden nun mit 100 µl GP, 100 µl E_2-Verdünnung (1:10000) pipettiert; danach von Hand kurz gemixt. Ihre Weiterbehandlung erfolgte mit dem Standard (siehe dort).

In die Recovery-Gläschen wurden 100 µl GP (21) einpipettiert, von Hand kurz gemixt und anschließend wieder 70 µl des Inhalts in vier, mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit gefüllte, Polyäthylen-Zählfläschchen (10) pipettiert. Dazu kamen noch 700 µl GP.
Die Zählfläschchen für Recovery wurden zusammen mit den 100 % - Recovery-Zählfläschchen in den Counter (38) gestellt und nach 30 min Wartezeit, mit einer Meßzeit von 10 min pro Fläschchen, gemessen.

Nach dem Messen wurden die Mittelwerte für Recovery und 100 % - Recovery berechnet und daraus der Faktor für Recovery ermittelt.
Dieser wurde bei der Datenauswertung im Klinikprogramm verwendet.

5.6.3 Aufstellung eines E_2-Standards für die Standard(Eich)-Kurve

a) B = Background = Leerwert: (3fache Ausführung)
Als Leerwert mit dem E_2-Gehalt Null wurde nur GP verwendet.

b) T = Total = Gesamtaktivität (6fache Ausführung)
Für die Messung der Gesamtaktivität enthielten die Glasteströhrchen nur GP und E_2-Tracer-Verdünnung.

a) und b) wurden nach der Inkubation nicht mit Kohle-Dextran-Suspension 5 mg Kohle pro ml behandelt.

c) N = Non specific = Unspezifische Bindung (3fache Ausführung)
Um das Maß der unspezifischen Bindung erfassen zu können, enthielten die Glasteströhrchen außer GP noch E_2-Tracer-Verdünnung.

d) O-Bindung = Bindungskapazität (3fache Ausführung)
Zur Bestimmung der Bindungskapazität enthielten die Glasteströhrchen GP, E_2-Tracer-Verdünnung und Anti-Serum-Verdünnung (1:10000).

e) Standardreihe (3fache Ausführung)
Die E_2-Stammlösung (31) wurde mit 0,1%-igem GP so verdünnt, daß in aufsteigender Reihe geeignete Konzentrationen erreicht wurden: 10 pg, 20 pg, 50 pg, 100 pg und 200 pg E_2 pro 100 µl.
Die Glasteströhrchen enthielten also die entsprechende E_2-Konzentration, E_2-Tracer-Verdünnung und Antiserum-Verdünnung (1:10000).

f) Proben (2fache Ausführung)
Als Probe bzw. Wiederfindungen wurden fünf Glasteströhrchen mit Plasma bzw. bekannter E_2-Menge und Plasma gefüllt (s. Extraktion).

5.6.4 Arbeitsschritte

a) Herstellung der E_2-Verdünnung (= 10000 cpm) aus dem E_2-Stamm-Tracer (27).

b) Herstellung der E_2-Antiserum-Verdünnung (1:10000) aus der eingefrorenen E_2-Antiserum-Verdünnung (1:100).

c) 0,1 % -igen Gelatinepuffer (21) bereitstellen.

d) In die "B-Gläser" = Gesamtaktivität 200 µl GP und 100 µl E_2-Tracer-Verdünnung (10000 cpm)

e) in die "T-Gläser" = Leerwert wurden 300 µl einpipettiert.

f) in die "N-Gläser" = Unspezifische Bindung wurden ebenfalls 200 µl GP und 100 µl E_2-Tracer-Verdünnung (10000 cpm) einpipettiert.

g) Die "O-Bindungs-Gläser" = Bindungskapazität erhielten 100 µl GP, 100 µl E_2-Tracer-Verdünnung (10000 cpm) und 100 µl E_2-Antiserum-Verdünnung (1:10000).

h) In die Standards wurden 100 µl der zugehörigen E_2-Standard-Konzentration, 100 µl E_2-Tracer-Verdünnung (10000 cpm) und 100 µl Anti-Serum-Verdünnung (1:10000) einpipettiert.

i) Die Proben- bzw. Wiederfindungsgläser wurden nach der Extraktion (s. dort) dem E_2-Standard beigestellt.

j) Alle Gläschen wurden von Hand kurz gemixt, in ein Transport-Gitter (17) gestellt, mit Laboratory-Film (16) abgedeckt und anschließend inkubiert.

Dieser aufgestellte Standard mit Proben bzw. Wiederfindung, Extraktion und Recovery, wurde zweifach ausgeführt, um die Auswirkung zweier verschiedener Inkubationzeiten zu untersuchen, d. h. der erste Standard mit Proben (Wiederfindung) wurde 4 Std. bei 4° C und der zweite 1 Std. bei 21° C inkubiert.

Siehe Abbildung 5, S. 64

5.6.5 Trennung des freien vom gebundenen Hormon

Dieser Vorgang entsprach dem des Prog-Assays (siehe dort).

5.6.6 Messung der Radioaktivität

Wie beim Prog-Assay (s. dort), nur beträgt die Zählzeit hier 10 min pro Zählfläschchen.

5.6.7 Datenauswertung

Wie beim Prog-Assay, mit entsprechendem Programm für E_2.

5.6.7.1 Teile des Programms

a) Standard-Programm

   Wie beim Prog-Assay, nur die Standards haben andere Konzentrationen.

b) Plotterprogramm

   Siehe Prog-Assay

c) Klinikprogramm

   Siehe Prog-Assay

6. ERGEBNISSE

6.1 Bestimmung der Bindungskapazität

In den Tabellen 1 und 2 sind die Bindungskapazitäten und Verdünnungs-Konzentrationen der untersuchten Antiseren dargestellt. Erkennbar ist, daß der Antiserumtiter von Hase zu Hase stark schwankte.
Die beste Bindungskapazität wiesen die Hasen Nr. 166 und Nr. 192 auf.

Als gut geeignet für Meßzwecke erwiesen sich bisher Antiserum-Verdünnungen, die etwa 35 - 40 % für Prog bzw. 30 - 35 % für E_2 des radioaktiv markierten Hormons binden.

6.2 Untersuchungen zur Genauigkeit der Messung der Radioaktivität bzw. statistische Unterschiede bei der Messung der Radioaktivität bei verschiedenen Wartezeiten und verschiedenen Meßzeiten

Wie Tabelle 3 zeigt, waren Standardabweichung und Standardfehler des Mittelwertes bei einer Wartezeit von 120 min und einer Meßzeit von 2 min pro Probe am geringsten, jedoch bestand zwischen den Wartezeiten von 30, 60 und 120 min kein signifikanter Unterschied, so daß aus ökonomischen bzw. praktischen Gründen eine Wartezeit von 30 min und eine Meßzeit von 2 min pro Probe ausreichend waren.

6.3 Prog-Radioimmunoassay

6.3.1 Richtigkeit

Die Richtigkeit des durchgeführten Radioimmunoassays wurde durch die Wiederfindung geprüft.
Die Beziehung zwischen erwarteten und beobachteten Werten wurde statistisch, durch die Berechnung der linearen Regressionsgleichung und durch die Berechnung des Korrelationskoeffizienten, erfaßt.

Regressionsgerade: $y = 92{,}9206 + 0{,}9014\ x$ für Assay Nr. 1
und $y = 159{,}9191 + 0{,}8449\ x$ für Assay Nr. 2.

Korrelationskoeffizient: 0,9723 für Assay Nr. 1 und
0,9938 für Assay Nr. 2.

Wie die Tabellen 4 a) und b) zeigen, lagen die Wiederfindungsraten bei höheren Hormonkonzentrationen (500 - 10000 pg) zwischen 81 und 96 %.

6.3.2 Bindungskapazität

Bei jeder Standardkurve wurde die Bindungskapazität durch das Programm automatisch mitberechnet.

$$BK = \frac{Bo}{T} \cdot 100$$

Bei den zwei Assays, die hier durchgeführt wurden, lag die Bindungskapazität bei 47 % für Assay Nr. 1 und bei 51 % für Assay Nr. 2.

6.3.3 Unspezifische Bindung

Auch die unspezifische Bindung wurde durch das Programm automatisch mitberechnet. Sie betrug 8,2 % beim Assay Nr. 1 und 10,2 % beim Assay Nr. 2.

6.3.4 Spezifität

Siehe 6.4

6.4 Kreuzreaktionen

Wie aus den Tabellen 5 und 6 zu ersehen ist, wiesen beide Antiseren nur geringe Kreuzreaktion mit den getesteten Steroiden auf; nur 4-Pregnen-11α-ol-3,20-dione (11α-Hydroxyprogesterone) und 4-Pregnen-11β-ol-3,20-dione (11β-Hydroxyprogesterone) zeigten eine gewisse Bindungsaffinität.

6.5 Untersuchung zur Bestimmung der optimalen Plasmamenge

Wie Tabelle 7 zeigt, war die Wiederfindung bei Plasmamengen bis 20 µl und bei einer Progesteron-Menge von 100 pg relativ hoch.
In Abbildung 1 wird der starke Abfall der Wiederfindung, vor allem bei 500 pg Progesteron, noch einmal verdeutlicht.
Ebenso wird erkennbar, daß, bei Plasmamengen > 20 µl, die Wiederfindung ebenfalls geringer wurde.

6.6 Untersuchung zur Kinetik

Trennung der Hormone mit verschiedenen Kohle-Dextran-Suspensionen

Wie der Tabelle 8 zu entnehmen ist, war die Wiederfindung bei einer Plasmamenge bis zu 20 µl, in einem Bereich von 300 - 500 pg Progesteron pro Probe und bei Verwendung der Kohle-Dextran-Konzentration von 20 mg Kohle zur Absorption des freien radioaktiven Progesterons, am höchsten.

In den "Abbildungen 2. a - c" wurde verdeutlicht, wie sich die Wiederfindung bei Verwendung verschiedener Kohle-Dextran-Suspensionen veränderte.

6.7 Weitere Versuche zur Bestimmung der optimalen Plasmamenge

Bei einer Plasmamenge von 10 µl im Standard und in den Wiederfindungs-Proben war die Wiederfindung am höchsten.

Siehe Tabelle 9

Abbildung 3 zeigt den Verlauf der Wiederfindungen der verschiedenen Radioimmunoassay-Ausführungen.

6.8 Untersuchungen zur Verkürzung der Inkubationszeit

Aus Tabelle 10 ist zu entnehmen, daß die Wiederfindungsrate bei einer Inkubationszeit von 4 Std. bei 4° C am höchsten war, jedoch ist für die angestrebte Schnellmethode eines Prog-Assays (Progesteron-Bestimmung direkt aus dem Plasma), eine Inkubationszeit von 1 Std. bei 21° C ausreichend.

Abbildung 4 veranschaulicht den Verlauf der Wiederfindungsraten der verschiedenen Radioimmunoassays bei verschiedenen Inkubationszeiten.

6.8.1 Richtigkeit der Methode

Siehe Wiederfindungsrate in Tabelle 10
Lineare Regressionsgleichung: y = - 7,3396 + 0,9869 x
Korrelationskoeffizient: 0,9996

6.8.2 Bindungskapazität

Sie wurde durch das Programm automatisch mitgerechnet.

$$BK = \frac{Bo}{T} \cdot 100 = 33,36\ \%$$

6.8.3 Unspezifische Bindung

Ebenfalls durch das Programm mitberechnet.
Sie betrug 7,3 %.

6.8.4 Spezifität

Siehe 6.4

6.9 Untersuchung zur Verkürzung der Rüttelzeit beim Vortex-Rüttler

Wie aus der Tabelle 11 ersichtlich ist, bestand zwischen den Rüttelzeiten von 30 min, 15 min und 5 min kein signifikanter Unterschied, so daß 5 min als Rüttelzeit ausreichend waren.

6.10 Untersuchung zur Verkürzung der Inkubationszeit beim E_2-Radioimmunoassay

Wie aus Abbildung 5 ersichtlich ist, war auch für den E_2-Ria eine Inkubationszeit von 1 Std. bei 21^{o} C, ebenso wie beim Prog-Assay, ausreichend.

7. DISKUSSION

Der Zweck der vorliegenden Arbeit war, eine Ria-Methode für die Hormone Progesteron und Estradiol (E_2) zu entwickeln, mit der es möglich ist, die Hormonkonzentration im peripheren Blut innerhalb kurzer Zeit zu bestimmen.

Obwohl es viele Methoden der Prog- und E_2-Bestimmung gibt, ist bis jetzt über Methoden, die die Ergebnisse noch am selben Tag bzw. innerhalb weniger Stunden zur Verfügung stellen, in der Literatur noch wenig berichtet worden.
Solche Methoden werden z. B. von DE VILLA et al. (1972), SPIELER et al. (1972) für Progesteron und von EDQUIST und JOHANSSON (1972) für E_2-beschrieben.
Jüngeren Datums ist z. B. eine Schnell-Methode von ASO et al. (1975) für Prog und Estradiol mit der binnen 5 Std. bei 25 Proben der Hormongehalt bestimmt werden kann. Das Verfahren wird von 2 Personen durchgeführt und beinhaltet noch den Arbeitsgang "Extraktion". Ebenfalls aus neuerer Zeit ist die Methode von STUPNICKI (1975). Er beschreibt die radioimmunologische Bestimmung des Progesterons direkt - ohne Extraktion - aus dem Plasma von Nutztieren.

Wir haben bei unseren Untersuchungen versucht, beide Hormone - Prog und E_2 - mittels eines Schnell-Verfahrens, direkt aus dem Plasma zu bestimmen.
Dies gelang uns beim Prog; beim E_2 haben wir schon im Vorversuch festgestellt, daß man bei diesem Hormon das gleiche Verfahren wie beim Prog nicht anwenden kann; dies dürfte in erster Linie durch die wesentlich geringere E_2-Konzentration im Plasma und die noch nicht ausreichende Spezifität des Antiserums bedingt gewesen sein. Es wurden jedoch Zeiteinsparungen bei der Extraktion und bei der Inkubation erreicht.
Bei den Untersuchungen hat sich herausgestellt, daß unsere anfangs angestellte Überlegung, nämlich die, daß durch den Einfluß der Plasma-Proteine die Messung der Prog-Hormone direkt

aus dem Plasma beeinflußt würde, zutraf. Dies zeigte sich auch schon bei der ersten Untersuchung 5.1 recht deutlich.
War hier die Wiederfindungsrate bei geringen Hormonmengen und bis zu einer Plasmamenge von 20 µl noch zufriedenstellend, so nahm sie bei Plasmamenge >20 µl stark ab; bei hohen Hormonkonzentrationen (ca. 500 pg) war die prozentuale Wiederfindung auch bei geringen Plasmamengen völlig unbefriedigend.
Siehe Tabelle 7 und Abbildung 1

Wesentlich verbessern konnten wir die Wiederfindungsraten durch Verwendung geringer Plasmamengen (10 und 20 µl) und vor allem durch Erhöhung der Kohle-Dextran-Konzentration auf das Vierfache (20 mg Kohle pro ml anstatt 5 mg Kohle pro ml).
Siehe Tabelle 8 a - c und Abbildung 2 a - c

Wirklich zufriedenstellende Wiederfindungsraten - nun auch bei höheren Prog-Konzentrationen - erreichten wir dadurch, daß wir nur noch 10 µl Plasma verwendeten und diese Plasmamenge nicht nur in die Proben- bzw. Wiederfindungs-Gläser pipettierten, sondern auch in die Standard-Gläser.
Durch diese Untersuchung war die Grundkonzeption des angestrebten Prog-Assays gefunden. Durch die Verkürzung der Inkubationszeit auf 1 Std. (21° C) bei der anschließenden Untersuchung wurde diese Konzeption in zeitlicher Hinsicht noch verbessert, so daß für diese Methode der Begriff "Schnell-Assay" nun völlig zutraf.

Die Prog-Assay-Methode, die von uns hier beschrieben wird, und von einer Person durchgeführt werden kann, ermöglicht es, bei 10 Doppelproben (max. 15 Doppelproben) den Progesterongehalt innerhalb von 8 Std. zu bestimmen. Vergleicht man diese Methode mit der früheren in unserem Labor durchgeführten Methode, so bedeutet dies eine enorme Zeiteinsparung und auch einen geringeren Materialaufwand.
Siehe Tabelle 12 und 13

Obwohl das Antiserum sehr spezifisch ist und auch die Prozent-Wiederfindungsraten relativ hoch - über 90 % - sind, so muß

doch mit Ungenauigkeiten bei der Bestimmung der Hormonkonzentrationen (Über- bzw. Unterbestimmung) gerechnet werden. Diese werden z. T. durch die Kreuzreaktionen gewisser Hormone (11α-Hydroxyprogesteron, 11ß-Hydroxyprogesteron) im Plasma verursacht, z. T. aber auch durch die unspezifische Bindung (Plasmaeiweiß) hervorgerufen.

Eine weitere Ursache der Ungenauigkeit liegt bei der relativ geringen Countzahl von 5000 cpm beim Messen der Proben im Counter; denn der Meßfehler bei 10000 cpm beträgt 1 %, bei 1000 cpm 8 % und bei 10 cpm 20 % laut MAISCH (1975). Außerdem haben ABRAHAM and ODELL (1970) sowie COLLINS et al. (1970) untersucht, daß man eine Probe bei mindestens 3000 cpm messen muß, um den Meßfehler auf 2 - 3 % zu beschränken.

Ungenauigkeiten bei der Hormonbestimmung werden außerdem noch durch die verkürzte Inkubationszeit (1 Std., 21° C) hervorgerufen.
Um optimale Ergebnisse zu erhalten, ist eine Inkubationszeit von mindestens 3 Std. bei 4° C angemessen.
RUNNEBAUM et al. (1972), DE VILLA et al. (1972), YOUSSEFNEJADIAN et al. (1972), SPIELER et al. (1972) geben Antiserum und Tracer gleichzeitig.
Für eine Schnell-Methode empfiehlt YOUSSEFNEJADIAN et al. (1972) eine Inkubationszeit von 15 min bei 37° C und bei ASO et al. (1975) wurde 10 min bei 60° C und anschließend 30 min bei 30° C inkubiert.
Wir verkürzten die Inkubationszeit auf 1 Std. bei 21°C. Dadurch wurde die initiale Bindung (Bindungskapazität) im Standard herabgesetzt und somit die Standardkurve verändert, daß der Assay bei geringeren Hormonkonzentrationen nicht so genau ist. Für eine genaue Bestimmung der Hormonwerte mag ein Schnell-Assay mit solchen Ungenauigkeiten zwar nicht zuverlässig sein, jedoch ist er für eine Routine-Bestimmung hinreichend genau und im Vergleich zu anderen Schnell-Assays ist die von uns gefundene Methode ebenso zuverlässig.

Von Bedeutung ist ebenfalls, daß unsere Methode auch materialsparend ist, d. h. es wird wenig Antiserum (pro Probe 0,1 ml der Konzentration 1:2000) und wenig Tracer, bedingt durch die relativ niedrige Countzahl von 5000 cpm, verbraucht.
Ebenfalls gering ist die benötigte Plasmamenge von weniger als 0,7 ml, denn pro Probe werden nur 10 µl Plasma - STUPNICKI (1975) benötigte 20 µl - einpipettiert.

Da mit unserer Methode das Progesteron direkt - ohne Extraktion - aus dem Plasma bestimmt werden kann, ist sie relativ einfach durchzuführen und vor allem sehr zeitsparend und kann deshalb im täglichen Rountinegebrauch - zur grob quantitativen Bestimmung der Prog-Konzentration - sinnvoll angewendet werden.

8. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit stellt eine Schnell-Methode eines Prog-Radioimmunoassays für den täglichen Routine-Gebrauch vor. Mit ihr kann, dank der hohen Spezifität des Antiserums, der Progesterongehalt direkt - ohne Extraktion und ohne Chromatographie - aus dem Plasma bestimmt werden.
Um 10 (max. 15) Doppelproben zu bestimmen, werden max. 8 Std. benötigt.
Die zur Bestimmung notwendige Plasmamenge beträgt 10 µl pro Probe, die Countzahl des Tracers 5000 cpm, die Antiserum-Verdünnung 1:2000 und die Inkubationszeit 1 Std. bei 21° C (Zimmertemperatur).
Zur Adsorption der freien Hormone werden 0,5 ml Kohle-Dextran-Suspension $\frac{20 \text{ mg Kohle}}{\text{ml}}$ verwendet.
Die Meßzeit pro Probe: 2 min.
Die Resultate unserer Methode sind mit denen anderer Schnell-Methoden vergleichbar.

9. METHODENVERGLEICH

Ablauf des Prog-Radioimmunoassays nach Verbesserung der Methode = Schnell-Methode (für zehn Doppelproben)

- Gelatine-Puffer bereitstellen, Prog-Tracer (5000 cpm) und Antiserum-Verdünnung (1:2000) herstellen	20 min
- O-Bindung (Antiserum-Austestung) austesten	90 min
- Standard-Gläser und Probe-Gläser (30 + 20 Gläser) beschriften und auf Transport-Gitter stellen (z.T. innerhalb der Meßzeit bei O-Bindungs-Test), Standard-Konzentration bzw. GP, Serum, Tracer und Antiserum-Verdünnung pipettieren und kurz mixen	80 min
- Inkubation: 1 Std. bei 21^{o} C	60 min
- 0,5 ml Kohle-Dextran-Suspension $\frac{20 \text{ mg Kohle}}{\text{ml}}$ zusetzen und 15 min bei 4^{o} C stehen lassen	20 min
- Zentrifugieren: 3000 Upm, 20 min	20 min
- Dekantieren in Zählfläschchen	25 min
- Wartezeit bis zum Messen im Counter	30 min
- Messen im Counter (30 + 20 Proben) 2 min pro Probe	100 min
- Auswertung der Daten mit dem Tischcomputer	20 min
	465 min
	= 7 Std. und 45 min

Ablauf des Prog-Radioimmunoassays vor Verbesserung der Methode

1. Tag

Plasma-Proben mit Recovery-Tracer versetzen und Herstellung der 100 %-Recovery-Werte	90 min
Inkubation über Nacht bei 4° C bzw. 21° C für 100 %	ca. 14 Std.
Prog-Tracer und Prog-Antiserum-Verdünnung herstellen	20 min
O-Bindung (Antiserum-Austestung) austesten	90 min

2. Tag

Extraktion

Petroleum-Äther zusetzen, rütteln, zentrifugieren, eindampfen, mit GP aufnehmen, rütteln (während Rüttelzeit bzw. Eindampfen ist Aufstellung der Standard- und Probengläser möglich)	240 min
Recovery-Proben in Zählfläschchen pipettieren und mit 100 % - Recovery-Werten im Counter messen (10 min pro Probe)	20 min
GP, Standard-Konzentration, Serum Tracer und Antiserum-Verdünnung in Standard- und Proben-Gläser pipettieren und kurz mixen	80 min
Inkubation über Nacht bei 4° C	ca. 14 Std.

3. Tag

0,5 ml Kohle-Dextran-Suspension $\frac{5 \text{ mg Kohle}}{\text{ml}}$ zugeben	20 min
Zentrifugation	20 min
dekantieren	25 min
Wartezeit bis zum Messen	120 min
Messen im Counter (2 min pro Probe) (30 + 20 Proben)	100 min
Auswertung der Daten im Tisch-computer	20 min

ANHANG

Tabellen

Abbildungen

n	Konzentration	Bindungskapazität in % Hase Nr.		
		166	167	168
3	1 : 1000	51	49	39
3	1 : 1500	43	40	30
3	1 : 2000	35	31	23
3	1 : 2500	32	44	20

Tabelle 1: Bindungskapazität der getesteten Prog-Antiseren bei verschiedenen Konzentrationen

n	Konzentration	Bindungskapazität in % Hase Nr.	
		192	193
3	1 : 5000	34	28
3	1 : 10000	30	26

Tabelle 2: Bindungskapazität der getesteten E_2-Antiseren bei verschiedenen Konzentrationen

n	Wartezeit in min bis zum Messen	Meßzeit in min	Standard-abweichung	Standardfehler des Mittelwertes
6	30	10	30,81	17,79
6	60	10	68,21	30,53
6	120	10	72,87	32,59
9	30	2	62,97	20,99
10	60	2	64,48	20,39
10	120	2	52,48	16,59

Tabelle 3: Standardabweichung und Standardfehler des Mittelwertes von Prog-Proben bei verschiedenen Wartezeiten und bei verschiedenen Meßzeiten

Zugegebene Prog-Menge in pg		Wiederfindung in %
a)	20	200
	50	200
	100	200
	500	97
	1000	113
b)	500	82
	1000	81
	2000	95
	5000	96
	10000	84

Tabelle 4 a, b: Wiederfindung von zugegebenen Prog-Mengen nach Korrektur des Null-Wertes

Steroide	Kreuzreaktion in % bei 10^4 pg	10^3 pg
4-Pregnen-3, 20-dione (Progesterone)	100	100
4-Androsten-17β-ol, 3-one (Testosterone)	1	6,5
5α-Androstan-3, 17-dione (Androstandione)	1	4
5α-Androstan-3α, 17β-diol (Dihydroandrosterone)	<1	5
1, 3, 5(10)-Estratrien-3, 17α-diol (E_1)	<1	4
1, 3, 5(10)-Estratrien-3, 17β-diol (E_2)	<1	2,5
1, 3, 5(10)-Estratrien-3, 16α, 17β-triol (E_3)	<1	5,5
5-Pregnen-3β-ol, 20-one (Pregnenolone)	2,7	9,5
4-Pregnen-16α-ol-3, 20-dione (16-Hydroxyprogesterone)	1,8	5
4-Pregnen-21-ol-3, 20-dione (11-Desoxycortcosterone)	3,8	10
4-Pregnen-17α, 21-diol-3, 20-dione (11-Desoxycortisol)	1	6
4-Pregnen-11β, 17α, 21-triol-3, 20-dione (Cortisol)	1,4	3
4-Pregnen-11β-ol-3, 20-dione (11β-Hydroxyprogesterone)	14	26
4-Pregnen-11α-ol-3, 20-dione (11α-Hydroxyprogesterone)	24	27
4-Pregnen-20β-ol, 3-one	3,6	6
4-Pregnen-20α-ol,3-one (20α-Hydroxyprogesterone)	1,8	9

Tabelle 5: Kreuzreaktion verschiedener Steroide mit Progesteron auf der Basis der 50%-Verdrängung

Steroide	Kreuzreaktion in % bei 10^4 pg	10^3 pg
1, 3, 5(10)-Estratrien-3, 17β-diol (E_2)	100	100
1, 3, 5(10)-Estratrien-3, 16α, 17β-triol (E_3)	0,5	1,3
1, 3, 5(10)-Estratrien-3-ol, 17-one (E_1)	1,2	5
4-Androsten-3, 17-dione (Androstendione)	<1	<1
5α-Androstan-3α-17β-diol (Dihydroandosterone)	<1	<1
4-Androsten-17β-ol, 3-one (Testosterone)	<1	<1
4-Pregnen-11β, 17α, 21-triol, 2-one (Cortisol)	<1	<1

Tabelle 6: Kreuzreaktion verschiedener Steroide mit E_2 auf der Basis der 50%-Verdrängung

Plasmamenge in µl	Wiederfindung in % bei Prog-Zugabe von 100 pg	500 pg
5	111	104
10	97	86
20	106	52
30	95	39
50	55	26

Tabelle 7: Wiederfindung bekannter Prog-Mengen in verschiedenen Plasmamengen

Plasmamenge in µl	Wiederfindung in % bei Prog-Zugabe von 300 pg	500 pg	700 pg	Kohle-Dextran-Suspension
5	83	70	70	
10	88	74	47	5 mg Kohle / ml
20	79	52	43	
5	75	68	69	
10	71	62	51	10 mg Kohle / ml
20	58	55	43	
5	93	83	87	
10	94	85	81	20 mg Kohle / ml
20	96	91	64	

Tabelle 8: Wiederfindung bekannter Prog-Mengen in verschiedenen Plasmamengen, bei gleicher Inkubationszeit und unterschiedlichen Kohle-Konzentrationen

Plasmamenge in µl in der Wiederfindung	Plasmamenge in µl im Standard	Wiederfindung in % bei Prog-Zugabe in pg von: 20	50	100	200	300	350	400	500
10	-	>200	138	123	116	93	107	90	95
20	-	>200	150	127	104	79	82	68	71
10	10	98	100	102	101	91	95	95	99
20	20	78	91	85	98	78	98	94	86

Tabelle 9: Wiederfindungsrate bekannter Prog-Mengen in unterschiedlichen Plasmamengen bei verschiedenen Assay-Ausführungen

Inkubationszeit	Wiederfindung in % bei Prog-Zugabe in pg von: 20	50	100	200	350	500
2 Std. bei 4° C	110	107	120	107	115	104
4 Std. bei 4° C	119	122	106	103	109	98
1 Std. bei 21° C	81	84	91	94	95	98
1 Std. bei 37° C	40	116	95	67	98	79

Tabelle 10: Wiederfindungsrate bekannter Prog-Mengen in 10 µl Plasma - in Proben und Standard - bei unterschiedlichen Inkubationszeiten

n	Rüttelzeit in min	Wiederfindung in %
7	30	61
7	15	63
7	5	60,5

Tabelle 11: Wiederfindungsrate von Plasmaproben bei verschiedenen Rüttelzeiten auf dem Multi-Vortex-Rüttler (E_2-Ria)

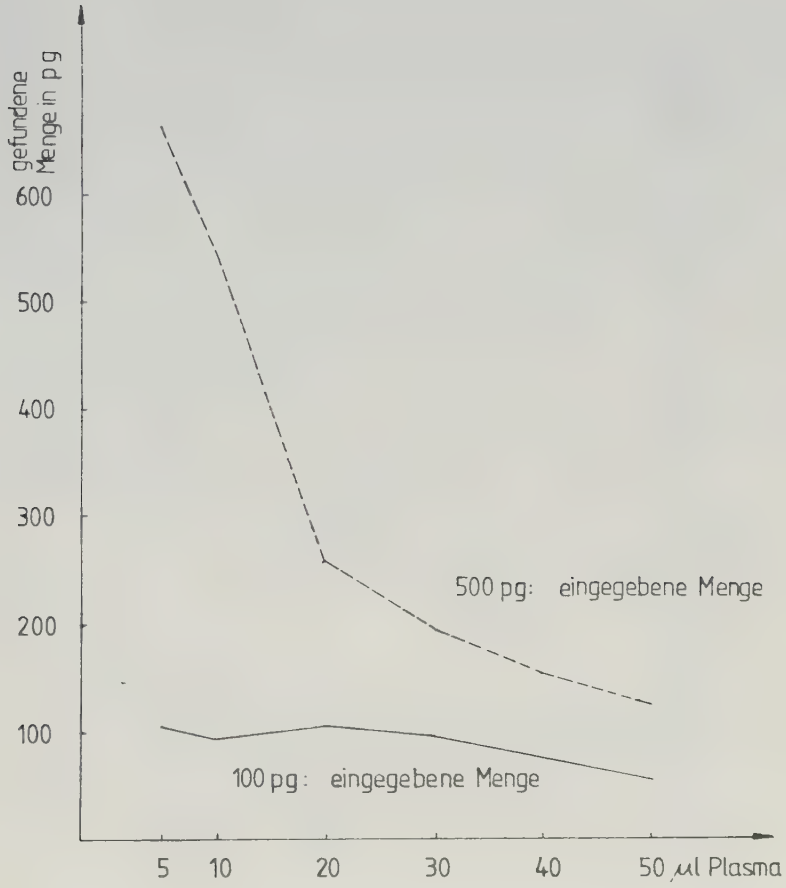
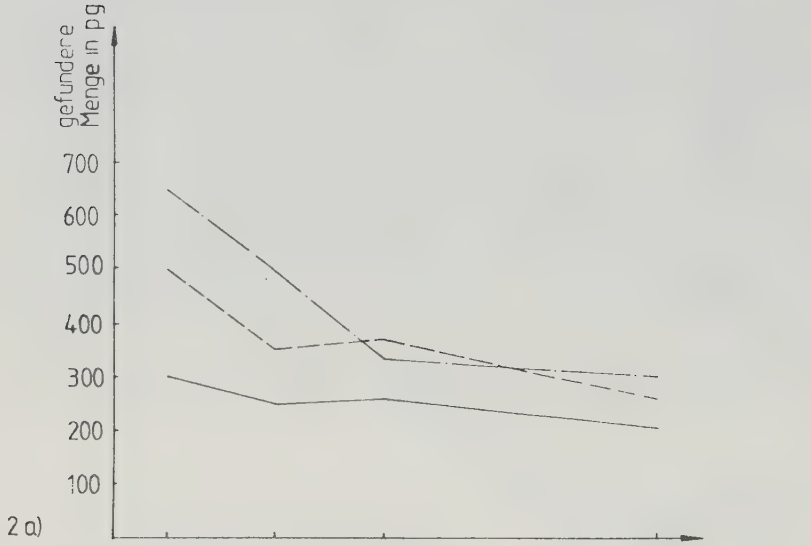
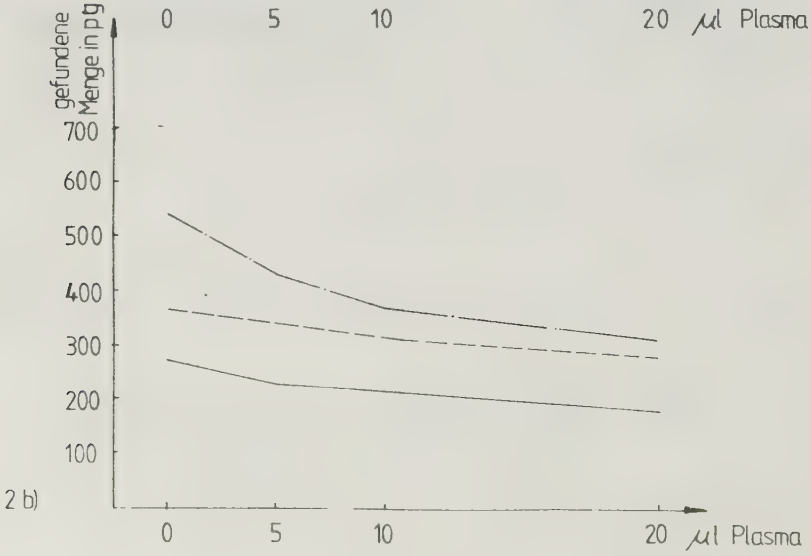


Abb. 1 Gemessen werden 100 und 500 pg Prog in unterschiedlichen Plasmamengen, bei gleicher Inkubationszeit und konstanter Kohle-Konzentration


gefundene Menge in pg
700
600
500
400
300
200
100
0
5
10
20
µl Plasma

2 a)


gefundene Menge in pg
700
600
500
400
300
200
100
0
5
10
20
µl Plasma

2 b)

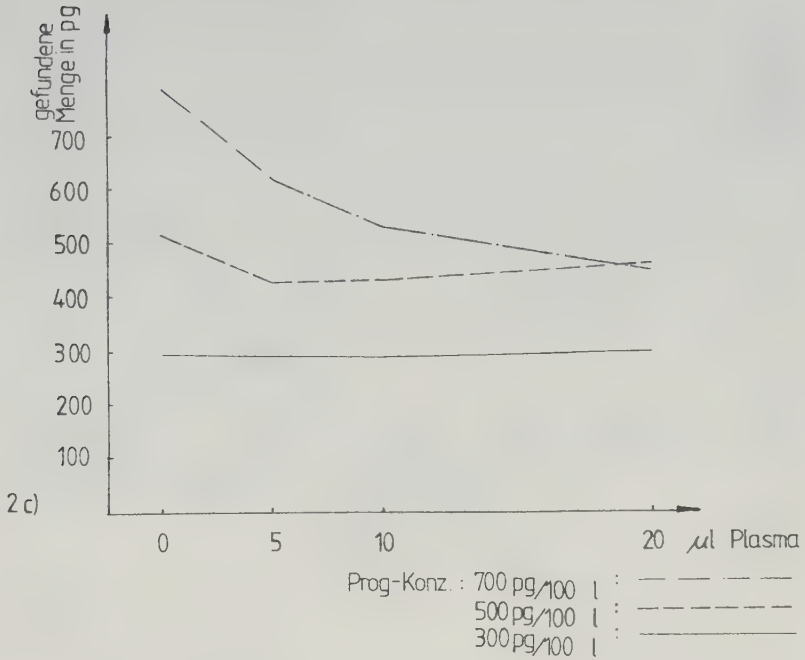


Abb. 2 a-c : Gemessen werden verschiedene Prog-Konzentrationen in 5,10 und 20 µl Plasma, bei gleicher Inkubationszeit und mit unterschiedlichen Kohle-Konzentrationen:

a) 5 mg Kohle/ml
b) 10 mg Kohle/ml
c) 20 mg Kohle/ml

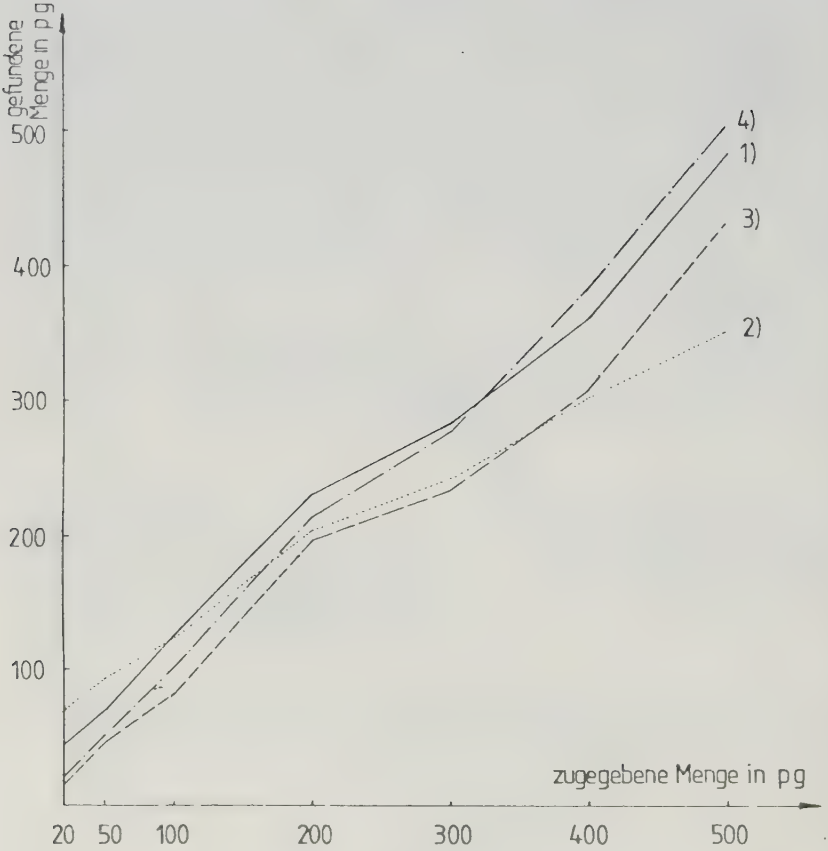


Abb 3 Gemessen werden bekannte Prog-Konzentrationen in unterschiedlichen Plasmamengen, bei konstanter Kohle-Konzentration und gleicher Inkubationszeit

1) ohne Plasma i. Standard u. 10 µl Plasma i.d. Wiederfindung
2) ohne Plasma i. Standard u. 20 µl Plasma i.d. Wiederfindung
3) 20 µl Plasma i. Standard u. 20 µl Plasma i.d. Wiederfindung
4) 10 µl Plasma i Standard u 10 µl Plasma i d Wiederfindung

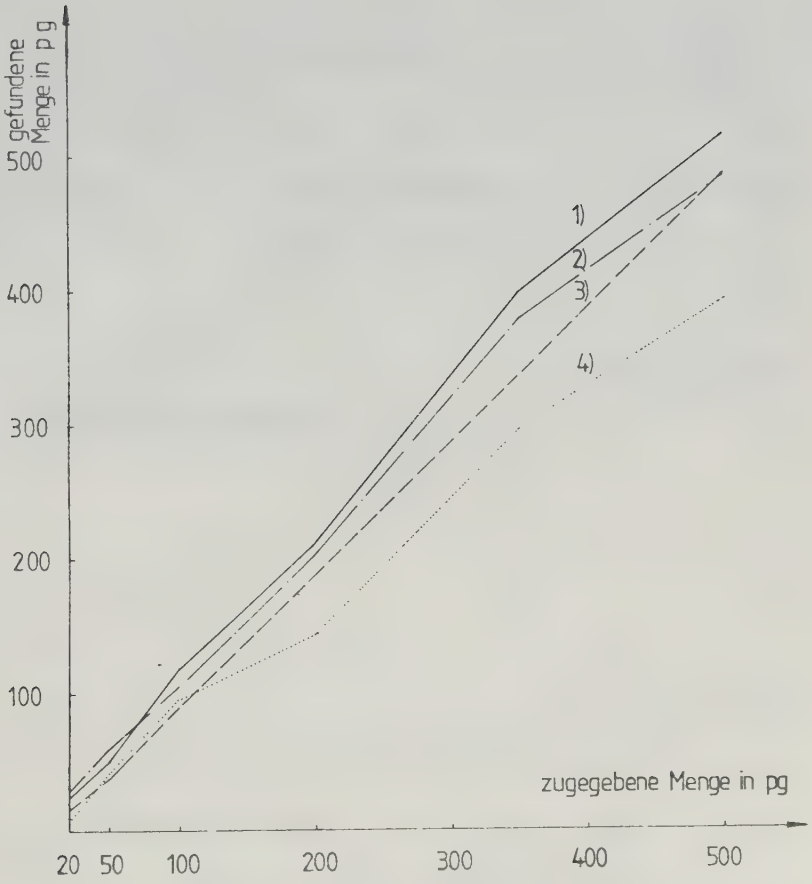


Abb 4 Gemessen werden verschiedene Prog-Konzentration in 10 µl Plasma, bei konstanter Kohle Konzentration und bei verschiedenen Inkubationszeiten:

1) 2 Std bei 4°C
2) 4 Std bei 4°C
3) 1 Std bei 21°C
4) 1 Std bei 37°C

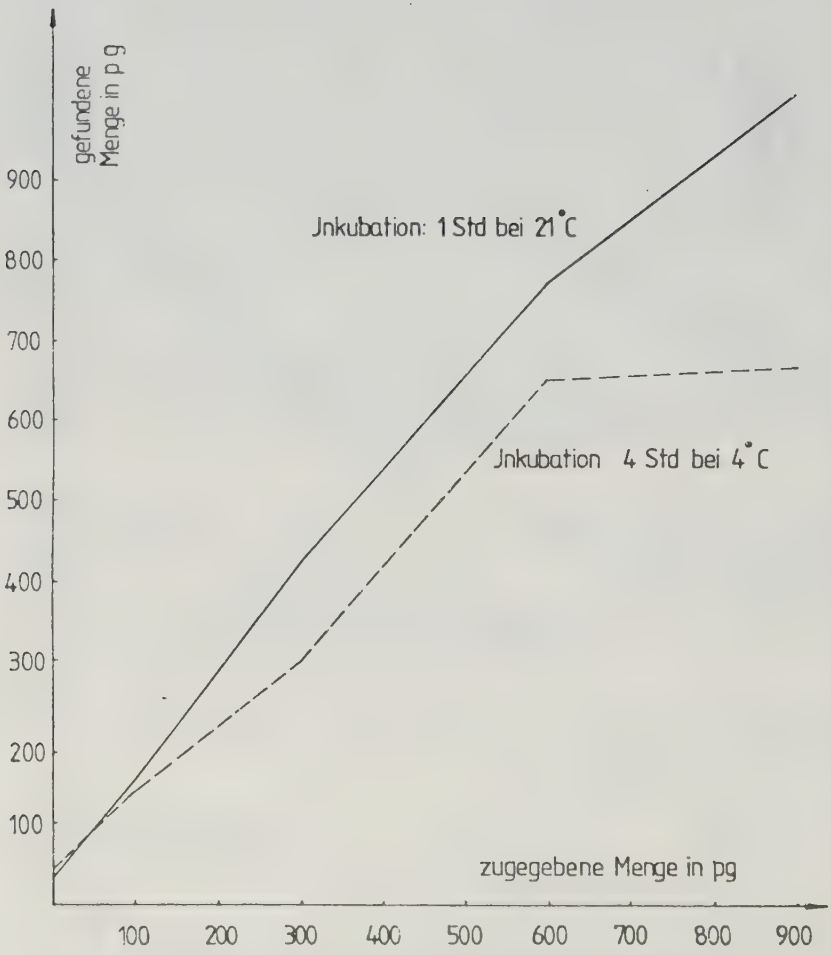


Abb. 5 Verlauf der Wiederfindung bei bekannter E_2-Menge und unterschiedlichen Jnkubationszeiten

10. LITERATURVERZEICHNIS

ABRAHAM, G.E.: Radioimmunoassay of steroids in biological materials
JAEA-SM-177, 207 (1973)

ABRAHAM, G.E., R. SWERDLOFF, D. TULCHINSKY and W.D. ODELL: Radioimmunoassay of plasma progesterone
I. Clin. Endocr. 32, 619-624 (1971)

ABRAHAM, G.E. and W.D. ODELL: Solid-phase radioimmunoassay of serum oestradiol-17β: A semi automated reproach
In: Immunologic methods in steroid determination
ed. by Péron, F.G. and B. V. Caldwell, New York: Appleton-Century-Crofts, 87-112 (1970)

ASO, T., R. GUERRERO, Z. CEKAN and E. DICZAFALUSY: A rapid 5 hour radioimmunoassay of progesterone and oestradiol in human plasma
Clin. Endocr. (Oxf.) 4, 173-182 (1975)

BERSON, S.A. and R.S. YALOW: Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods
Nature (London) 184, 1648-1649 (1959)

BODLEY, F.H., A. CHAPEDELAINE, G. FLICKINGER, G. MIKHAIL, S. YAVERBAUM and K.D. ROBERTS: A highly specific radioimmunoassay for progesterone using antibodies covalently linked arylamineglass particles
Steroids 21, 1-16 (1973)

COLLINS, W.P., M.D. MANSFIELD, N.S. ALLADINA and J.F. SOMMERVILLE: Radioimmunoassay of plasma testosterone
J Steroid Biochem. 3, 333-348 (1972)

DOERR, P.: Hapten-radioimmunoassay of plasma oestradiol
Acta Endocr. 72, 330-344 (1973)

EDQUIST, L.-E. and E.D.B. JOHANSSON: Radioimmunoassay of oestrone and oestradiol in human and bovine peripheral plasma
Acta Endocr. 71, 716-730 (1972)

EMMENT, Y., W.P. COLLINS and J.F. SOMMERVILLE: Radioimmunoassay of estrone and oestradiol in human plasma
Acta Endocr. 69, 567-582 (1972)

FRIEDRICH, E., E.R. JEGER-WHITEGIVER, M. BIEDER, H. HALVERSCHEIDT, P. PENKE, P. PALLAI, E. KELLER and A.E. SCHINDLER: Standardization of specific radioimmunoassay for plasma progesterone, estradiol, estrone and androstendione
Acta Endocr. 75, Suppl. 184,89 (1974)

FURUYAMA, S. and C.A. NUGENT: A radioimmunoassay for plasma progesterone
Steroids 17, 663-674 (1971)

LINDNER, H.R., E. PEREL, A. FRIEDLANDER and A. ZEITLIN: Specifity of antibodies to ovarian hormones in relation to the site of attachment of the steroid hapten to the peptide carrier
Steroids 19, 357-375 (1972)

MAISCH, S.: Simultane radioimmunologische Bestimmung von Plasmaandrogenen und -östrogenen von Kindern während der Pubertät
Universität Tübingen, Med. Fakultät, Dissertationsarbeit (1975)

MIKHAIL, G.CH.WU., M. FERIN and R.L. VANDE WIELE: Radioimmunoassay of plasma estrone and estradiol
Steroids 15, 333-341 (1970)

MISHELL, D.R., R.M. NAKAMURA, P.G. CROSIGINANI, S. STONE, K. KHARMA, Y. NAGATA and J.H. THORNEYCROFT: Serum gonadotrophine and steroid patterns during the normal menstrual cycle
Amer. J. Obstet. Gynecol. 111, 60-65 (1971)

RUNNEBAUM, B.: Methods of Hormone Research, 2 nd Edition (Ed. R. Dorfman), Academie Press
New York and London 1968

SPIELER, J.M., R.L. WEBB, R.J. SALDARINI and J. COPPOLA: A radioimmunoassay for progesterone
Steroids 19, 751-762 (1972)

STUPNICKI, R: Direct radioimmunoassay of progesterone in plasma of farm animals
Endokrinologie 66, 145-151 (1975)

TULCHINSKY, D.: Placental secretion of unconjugated estrone, estradiol and estriol into the maternal and fetal circulation
J. Clin. Endocr. 36, 1079-1087 (1973)

YOUSSEFNEJADIAN, E., E. FLORENSA, W.P. COLLINS and J.F. SOMMERVILLE: Radioimmunoassay of plasma progesterone
J. Steroid Biochem. 3, 893-901 (1972)

LEBENSLAUF

Am 12. Mai 1943 wurde ich, Rolf Breitenbücher, als Sohn des Hugo Breitenbücher und seiner Ehefrau Klara, geb. Rauscher, in Bietigheim geboren.

Von 1949 - 1953 besuchte ich die Volksschule in Bissingen und von
1953 - 1959 das Gymnasium in Bietigheim
1959 - 1962 erlernte ich das Mechanikerhandwerk
1962 - 1963 arbeitete ich als Mechaniker
1963 - 1964 Wehrdienst beim Bundesgrenzschutz
1965 Ausbildung zum Maschinenbautechniker
1966 - 1972 Refa-Ausbildung und Tätigkeit in verschiedenen Betrieben der Metallindustrie in den Bereichen: Betriebsmittelkonstruktion, Kalkulation, Fertigungsplanung
1970 - 1973 Abendgymnasium in Stuttgart
Abschluß: Reifeprüfung
1974 - 1981 Studium der Medizin in Tübingen

9.4.1981 Medizinisches Staatsexamen